

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Mesilato de gemifloxacino: desenvolvimento e validação de métodos analíticos, teste de dissolução e estudo de estabilidade

CLÉSIO SOLDATELI PAIM

PORTO ALEGRE, 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Mesilato de gemifloxacino: desenvolvimento e validação de métodos analíticos, teste de dissolução e estudo de estabilidade

Tese apresentada por **Clésio Soldateli Paim** para obtenção
do GRAU DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador(a): Profa. Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval

Coorientador: Prof. Dr. Martin Steppe

PORTO ALEGRE, 2012.

CIP - Catalogação na Publicação

PAIM, CLÉSIO SOLDATELI

Mesilato de gemifloxacino: desenvolvimento e validação de métodos analíticos, teste de dissolução e estudo de estabilidade / CLÉSIO SOLDATELI PAIM. -- 2012.

154 f.

Orientador: ELFRIDES EVA SCHERMAN SCHAPOVAL.

Coorientador: MARTIN STEPPE.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. cromatografia líquida . 2. eletroforese capilar. 3. isolamento e elucidação de produtos de degradação. 4. mesilato de gemifloxacino. 5. segurança biológica. I. SCHAPOVAL, ELFRIDES EVA SCHERMAN , orient. II. STEPPE, MARTIN, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A parte dos estudos de segurança biológica foram realizados durante Estágio Sanduíche no Exterior com bolsa CNPq no Departament de Fisiologia da Facultat de Farmácia da Universitat de Barcelona (Espanha) e na Unidad de Toxicologia y Ecotoxicologia del Parc Cientific de Barcelona (Espanha), sob orientação da Prof(a) Dr. María Pilar Vinardell.

De acordo com as normas vigentes no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, o presente trabalho de tese foi redigido na forma de capítulos, com encarte de publicações, para uma melhor compreensão e discussão dos resultados obtidos. Assim, este exemplar encontra-se dividido da seguinte forma:

- ✓ Introdução: contendo a apresentação do tema;
- ✓ Objetivo geral e objetivos específicos;
- ✓ Revisão bibliográfica;
- ✓ Capítulo I: Caracterização da substância química de referência (SQR) de mesilato de gemifloxacino (MGF);
- ✓ Capítulo II: Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação qualitativa de MGF em comprimidos revestidos;
- ✓ Capítulo III: Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação quantitativa de MGF em comprimidos revestidos – Encarte de publicações;
- ✓ Capítulo IV: Desenvolvimento e validação do teste de dissolução para comprimidos de MGF – Encarte da publicação;
- ✓ Capítulo V: Estudos de estabilidade: isolamento e identificação do produto de degradação majoritário – Encarte da publicação;
- ✓ Capítulo VI: Estudos de segurança biológica – Encarte de publicação;
- ✓ Discussão geral;
- ✓ Conclusões;
- ✓ Referências;
- ✓ Anexos.

AGRADECIMENTOS

À Professora Elfrides E. S. Schapoval pela orientação e confiança demonstrada durante o desenvolvimento dessa Tese.

Ao Professor Martin Steppe pela orientação e dedicação durante o desenvolvimento desse trabalho.

À Prof Nádia pelo auxílio na realização dos estudos de Biofarmácia e pela disposição em sempre colaborar.

Ao Professor Tércio Oppe e a Prof Célia pelo auxílio e presteza demonstrados.

À professora Cássia pelo auxílio e amizade.

À Prof Bibiana Araújo pela colaboração nos estudos de Biofarmácia e pela amizade.

Aos meus amigos do Laboratório pela amizade e conhecimentos adquiridos: Alianise, Alini, Aline Barth, Amanda, Barbara, Caren, Fernanda Batisti, Gabriela, Jaison, Letícia, Mariana, Maximiliano, Rúbia e Vítor. Em especial à bolsista Fernanda pela colaboração na execução desse trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico, em especial a Lorena, pelo auxílio durante a realização desse trabalho.

À Magda, pelo auxílio e amizade durante a graduação e pós-graduação.

Ao meu amigo Diogo Miron pelas discussões científicas e colaboração no desenvolvimento do estudo de robustez.

Ao Laboratório de Fisiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Barcelona. Em especial a minha orientadora no Exterior Professora Dr Pilar Vinardell e à Daniele Rubert Nogueira pela amizade e auxílio nos experimentos de citotoxicidade e fototoxicidade.

À minha irmã Elisangela Paim pelo apoio, amor e companheirismo.

À minha sobrinha Amanda, minha irmã Luciane e meu cunhado Ivan, partes importantes de minha família.

À Lisiane Bajerski pelo amor e companheirismo, extremamente importantes nesse momento.

Aos meus pais Albino e Nilza, pessoas mais importantes de minha vida, pela educação prestada, apoio, amor e por sempre acreditarem em mim.

Ao Programa de Pós-Graduação desta Faculdade pelas condições de trabalho oferecidas.

A CAPES-REUNI e ao CNPQ pelos suportes financeiros.

RESUMO

A análise de fármacos é fundamental nas diversas fases do desenvolvimento farmacêutico, tais como em estudos de formulação, estabilidade e controle de qualidade do produto. O mesilato de gemifloxacino (MGF), liberado para uso clínico no Brasil em novembro de 2006 com o nome comercial de Factive[®], é uma fluorquinolona indicada para o tratamento da exacerbação aguda da bronquite crônica e da pneumonia adquirida da comunidade. A literatura pesquisada apresenta poucos relatos de determinação quantitativa e de estudos de estabilidade do fármaco em comprimidos revestidos. Anteriormente aos estudos, foi realizada a caracterização da substância química de referência (SQR) de MGF por espectrofotometria no infravermelho (E IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e carbono (RMN ¹³C), análise térmica por calorimetria exploratória de varredura (DSC) e determinação da faixa de fusão. Métodos analíticos para determinação qualitativa e quantitativa foram desenvolvidos e validados por espectrofotometria na região do ultravioleta (E UV) e visível (E VIS), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), eletroforese capilar (EC) e ensaio microbiológico pelo método de cilindros em placas. A validação de um método de dissolução baseado em dados *in vivo* do fármaco também foi realizada. A elucidação do produto de degradação isolado em condições alcalinas foi realizada por E IV, RMN de ¹H, ¹³C e correlação (COSY, HSQC e HMBC), espectrometria de massas (EM) e emissão atômica. Estudos de citotoxicidade, fototoxicidade, genotoxicidade e fotogenotoxicidade foram empregados para conhecimento da toxicidade dos produtos analisados.

Palavras-chave: cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar, isolamento e elucidação de produtos de degradação, mesilato de gemifloxacino, estudos de segurança biológica.

ABSTRACT

The drug analysis is essential in all areas of the pharmaceutical development, such as during formulation studies, stability and quality control of the product. Gemifloxacin mesylate (GFM), approved for clinical use in Brazil in November of 2007 with the commercial name of Factive[®], is a fluoroquinolone prescribed for the treatment of acute exacerbations of chronic bronchitis and community-acquired pneumonia. The research literature shows a few studies of quantitative determination and stabilities studies of the drug in coated tablets. Previously, it was performed the characterization of the reference chemical substance of GFM by infrared spectrometry (IR), nuclear magnetic resonance of ¹H (¹H NMR) and ¹³C (¹³C NMR), thermal analysis by differential scanning calorimetry (DSC) and determination of the melting range. Analytical methods for qualitative and quantitative determination were developed and validated by ultraviolet (UV) and visible (Vis) spectrophotometry, high-performance liquid chromatography (HPLC), capillary electrophoresis (CE) and microbiological assay applying the cylinder–plate method. The validation of the dissolution method based on *in vivo* data of the GFM was also performed. The elucidation of the isolate degradation product in alkaline conditions was performed by IR, ¹H, ¹³C and correlation (COSY, HSQC and HMBC) NMR, and mass spectrometry (MS). Cytotoxicity, phototoxicity, genotoxicity and photogenotoxicity studies were carried out for the toxicity knowledge of the analyzed products.

Keywords: high performance liquid chromatography, capillary electrophoresis, isolation and elucidation of degradation products, gemifloxacin mesylate, biological safety studies.

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1. Condições eletroforéticas descritas para determinação quantitativa de quinolonas.....	19
TABELA 4.1. Frequências de absorção das principais bandas de absorção de MGF e suas respectivas atribuições.....	32
TABELA 4.2. Atribuições do espectro de RMN ¹ H do MGF em <i>DMSO</i> _{d6} ..	33
TABELA 4.3. Atribuições do espectro de RMN ¹³ C do MGF em <i>DMSO</i> _{d6} ..	34
TABELA 5.1. Determinação da solubilidade da SQR de MGF conforme a FB 5 (2010).....	41
TABELA 5.2. Condições cromatográficas definidas para identificação e quantificação de MGF nos comprimidos revestidos por CLAE.....	48
TABELA 5.3. Condições eletroforéticas otimizadas para quantificação de MGF nos comprimidos revestidos por EC.....	51
TABELA 13.1. Resumo dos resultados obtidos para determinação quantitativa de MGF utilizando diferentes métodos analíticos.....	131
TABELA 13.2. Análise da variância (ANOVA) dos resultados obtidos para determinação quantitativa de MGF utilizando diferentes métodos analíticos.....	131
TABELA 13.3. Resultados do estudo de estabilidade dos comprimidos triturados mantidos em estufa de calor seco a 60 °C.....	131

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1. Estrutura química do MGF.....	12
FIGURA 4.1. Curva sem prévio aquecimento obtida por DSC para a SQR de MGF.....	28
FIGURA 4.2. Curva com prévio aquecimento obtida por DSC para a SQR de MGF.....	29
FIGURA 4.3. Espectro de absorção na região do IV da SQR de MGF.....	31
FIGURA 4.4. Espectro de RMN ¹ H em DMSO _{d6} e respectiva estrutura química de MGF com as atribuição dos sinais.....	33
FIGURA 4.5. Espectro de RMN ¹³ C em DMSO _{d6} da SQR de MGF e respectiva estrutura química de MGF com as atribuição dos sinais.....	34
FIGURA 5.1. Estrutura química do cloridrato de ciprofloxacino.....	42
FIGURA 5.2. Cromatograma obtido por CCD na análise da solução da SQR de MGF, solução amostra dos comprimidos de MGF e da solução da SQR de cloridrato de ciprofloxacino.....	43
FIGURA 5.3. Espectros sobrepostos no UV das soluções da SQR e da solução amostra dos comprimidos de MGF em água a 10 µg/ml.....	45
FIGURA 5.4. Espectros sobrepostos no UV das soluções da SQR e da solução amostra dos comprimidos de MGF em metanol a 12 µg/ml.....	45
FIGURA 5.5. Espectros sobrepostos na região do VIS do complexo formado entre as soluções da SQR e da solução amostra dos comprimidos de MGF com verde de bromocresol.....	47
FIGURA 5.6. Cromatogramas sobrepostos da SQR de MGF e da solução amostra dos comprimidos de MGF a 20 µg/ml.....	49
FIGURA 5.7. Espectros sobrepostos de absorção na região do UV obtidos em detector de arranjo de fotodiodos.....	49
FIGURA 5.8. Eletroferogramas sobrepostos da SQR de MGF e da solução amostra dos comprimidos de MGF a 20 µg/ml em tampão borato de sódio 25 mM pH 7,5.....	52
FIGURA 5.9. Espectros sobrepostos de absorção na região do UV (200 a 350 nm) obtidos em detector de arranjo de fotodiodos, acoplado ao sistema de EC, das soluções de SQR de MGF e da amostra dos comprimidos de MGF.....	53
FIGURA 13.1. Espectro de RMN de ¹ H do produto de degradação isolado.....	125
FIGURA 13.2. Espectro de RMN de C13 do produto de degradação isolado.....	126
FIGURA 13.3. Espectro de RMN de HMBC do produto de degradação isolado.....	127
FIGURA 13.4. Espectro de RMN de HSQC do produto de degradação isolado.....	128
FIGURA 13.5. Espectro de RMN de COSY do produto de degradação isolado.....	129
FIGURA 13.6. Espectro de absorção no infravermelho do produto de degradação isolado.....	130

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
CIVIV	Correlação <i>in vitro</i> – <i>in vivo</i>
DAD	Detector de arranjo de fotodiodos
DMSO _{d6}	Dimetilsulfóxido deuterado
DSC	Calorimetria exploratória de varredura
EC	Eletroforese capilar
FB	Farmacopeia Brasileira
FDA	Food and Drug Administration
GFM	Gemifloxacin mesylate
gl	Graus de Liberdade
ICH	International Conference on Harmonization
MGF	Mesilato de gemifloxacino
r	Coeficiente de correlação de Pearson
Rf	Fator de retenção
SQ	Soma dos Quadrados
SQR	Substância química de referência
USP	United States Pharmacopoeia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	05
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	09
3.1. Histórico das quinolonas.....	11
3.2. Relação estrutura – atividade das quinolonas.....	12
3.3. Indicações.....	13
3.4. Atividade farmacológica.....	13
3.5. Farmacodinâmica e farmacocinética.....	14
3.6. Reações adversas.....	15
3.7. Descrição do fármaco.....	15
3.8. Determinação qualitativa e quantitativa.....	16
3.8.1. Espectrofotometria na região do ultravioleta (E UV) e do visível (E VIS)...	16
3.8.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	17
3.8.3. Ensaio microbiológico.....	17
3.8.4. Eletroforese capilar (EC).....	18
3.9. Teste de dissolução.....	19
3.10. Determinação de impurezas e estudos de segurança biológica.....	20
3.11. Estabilidade - Isolamento e identificação de produtos de degradação.....	22
4. CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR) DE MESILATO DE GEMIFLOXACINO (MGF).....	25
4.1. Introdução.....	27
4.2. Substância química de referência (SQR).....	27
4.3. Parte experimental.....	27
4.3.1. Caracterização da SQR de MGF.....	27
4.3.1.1. Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	28
4.3.1.1.1. Resultados e discussão.....	28
4.3.1.2. Faixa de fusão pelo método de capilar.....	29
4.3.1.2.1. Resultados e discussão.....	30
4.3.1.3. Faixa de fusão utilizando microscópio de ponto de fusão tipo Kofler.....	30
4.3.1.3.1. Resultados e discussão.....	30
4.3.1.4. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....	30
4.3.1.4.1. Resultados e discussão.....	31

4.3.1.5. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H) e de carbono (RMN ¹³ C).....	32
4.3.1.5.1. Resultados e discussão.....	32
4.4. Conclusões.....	35
5. CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO QUALITATIVA.....	37
5.1. Introdução.....	39
5.2. Produto farmacêutico.....	40
5.3. Parte experimental.....	40
5.3.1. Determinação da solubilidade da SQR de MGF.....	40
5.3.1.2. Resultados e discussão.....	40
5.3.2. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	41
5.3.2.1. Condições cromatográficas.....	41
5.3.2.2. Resultados e discussão.....	42
5.3.3. Espectrofotometria na região do UV e do visível.....	44
5.3.3.1. Condições espectrofotométricas para a E UV.....	44
5.3.3.1.1. Resultados e discussão.....	44
5.3.3.2. Condições espectrofotométricas para a E VIS.....	46
5.3.3.2.1. Resultados e discussão.....	46
5.3.4. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	48
5.3.4.1. Condições cromatográficas.....	48
5.3.4.2. Resultados e discussão.....	49
5.3.5. Eletroforese capilar (EC).....	50
5.3.5.1. Condições eletroforéticas.....	50
5.3.5.2. Resultados e discussão.....	51
5.4. Conclusões.....	53
6. CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE MGF EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS.....	55
6.1. Introdução.....	57
6.2. Validação do método por E UV - Gemifloxacin mesylate (GFM): UV spectrophotometric method for quantitative determination using experimental design for robustness evaluation.....	59

6.3. Validação do método por E Vis - High selective colorimetric method to determine gemifloxacin mesylate (GFM) in the presence of the synthetic impurity 1-cyclopropyl-6-fluoro-7-chloro-4-oxo-1,4-dihydro-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid.....	63
6.4. Validação do método por CLAE - Stability-indicating LC assay and determination of system suitability limits with a robustness test of gemifloxacin mesylate in tablets.....	67
6.5. Validação do ensaio microbiológico - Gemifloxacin mesylate (GFM) stability evaluation applying a validated bioassay method and <i>in vitro</i> cytotoxic study.....	71
6.6. Validação do método por EC - Simultaneous analysis of gemifloxacin mesylate and its main synthetic impurity by an optimized capillary zone electrophoretic method.....	75
7. CAPÍTULO IV – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO TESTE DE DISSOLUÇÃO PARA COMPRIMIDOS DE MGF.....	79
7.1. Introdução e resultados do artigo Gemifloxacin mesylate (GFM): dissolution test based on <i>in vivo</i> data	81
8. CAPÍTULO V – ESTUDO DE ESTABILIDADE: ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO.....	85
8.1. Introdução e resultados do artigo Structural elucidation of gemifloxacin mesylate degradation product	87
9. CAPÍTULO VI – ESTUDOS DE SEGURANÇA BIOLÓGICA.....	91
8.1. Introdução e resultados do artigo Biological safety studies of gemifloxacin mesylate and related substances	93
10. DISCUSSÃO GERAL.....	97
11. CONCLUSÕES.....	109
12. REFERÊNCIAS.....	113
13. ANEXOS.....	123

1. INTRODUÇÃO

Após a descoberta do ácido nalidíxico, o precursor dos antibacterianos quinolônicos, mais de 7000 novos análogos foram documentados na literatura (LI *et al.*, 2007). Com a síntese das fluorquinolonas (FQ) nos anos 70 e 80 e a ampliação do espectro de ação, as quinolonas passaram de uma classe de quimioterápicos antibacterianos de uso relativamente pequeno e sem importância para uma das classes mais utilizadas clinicamente (PICÓ e ANDREU, 2007).

As fluorquinolonas apresentam alta atividade contra bacilos Gram-negativos, porém questionável atividade contra importantes micro-organismos Gram-positivos (ZHANEL e NOREDDIN, 2001). Diante disso, novos fármacos foram sintetizados com o interesse em melhorar a atividade da classe, dentre eles, o mesilato de gemifloxacino (MGF), uma naftiridina que apresenta potência contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e anaeróbias (HONG *et al.*, 1997).

Nos Estados Unidos, o medicamento está liberado para as indicações de exacerbação aguda da bronquite crônica e pneumonia adquirida da comunidade (FDA, 2008) desde abril de 2003. Nesse país, as infecções do trato respiratório são a principal causa de morte em casos de doenças infecciosas. A pneumonia é a sexta maior causa de morte, com aproximadamente 2 a 3 milhões de casos de pneumonia adquirida da comunidade anualmente e 45000 óbitos. A exacerbação aguda da bronquite crônica atinge 13 milhões de pessoas e mortalidade superior a 30% em pacientes hospitalizados (GROSSMAN *et al.*, 2005).

No Brasil, o produto comercializado na forma de comprimidos revestidos de 320 mg de gemifloxacino, foi liberado pela ANVISA, em novembro de 2006, com o nome comercial de Factive[®]. A responsabilidade de produção e comercialização no país pertence ao Aché Laboratórios Farmacêuticos S. A.

A análise de fármacos é fundamental nas diversas fases de desenvolvimento farmacêutico, tais como estudos de formulação, estabilidade e controle de qualidade. A falta de métodos confiáveis para avaliação da qualidade dos produtos farmacêuticos limita a eficiência dos programas de validação e da vigilância desses produtos (SWARTZ e KRULL, 1998). Diante disso, somente a validação de métodos analíticos, utilizados para avaliar a qualidade dos fármacos, garante que os mesmos atendam às exigências das aplicações analíticas e assegure a confiabilidade dos

resultados (BRASIL, 2003; ICH 2005a; USP 34, 2011). Atualmente, é de suma importância o conhecimento dos fatores inerentes à estabilidade dos fármacos. O conhecimento das rotas, o isolamento e a identificação dos produtos de degradação pode garantir a administração terapêutica do medicamento de uma maneira segura e eficaz, evitando efeitos adversos e a perda da atividade.

A literatura pesquisada apresenta poucos trabalhos publicados de determinação quantitativa, estudo de estabilidade e teste de dissolução (ELBASHIR *et al.*, 2008; KRISHNA e SANKAR, 2008a; KRISHNA e SANKAR, 2008b; FDA 2010; GANDHIMATHI *et al.*, 2010; RANJANE *et al.*, 2010; TAVARES *et al.*, 2011). Com base no exposto, a validação de métodos analíticos para realização do controle de qualidade do fármaco em comprimidos revestidos, possibilitando a análise qualitativa e quantitativa, o teste de dissolução, o estudo de estabilidade, o isolamento e a elucidação estrutural do produto de degradação majoritário formado e estudos de segurança biológicas dos produtos justificam a realização deste trabalho.

Desta forma, objetiva-se colaborar com o controle de qualidade do MGF na forma farmacêutica de comprimidos revestidos, de modo a garantir segurança e eficácia aos pacientes usuários deste medicamento.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Desenvolver metodologia analítica para a determinação qualitativa e quantitativa do MGF em comprimidos revestidos, bem como teste de dissolução, estudo de estabilidade, isolamento e elucidação do(s) produto(s) de degradação majoritário(s) formado(s) e estudos de segurança biológica.

2.1.1. Objetivos específicos

- Caracterizar a substância química de referência (SQR) de MGF por espectrofotometria na região do infravermelho (E IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono (RMN ^{13}C), análise térmica por calorimetria exploratória de varredura (DSC) e determinação da faixa de fusão;
- Identificar o fármaco MGF nos comprimidos revestidos por cromatografia em camada delgada (CCD), espectrofotometria na região do ultravioleta (E UV) e visível (E VIS), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC);
- Desenvolver e validar métodos para quantificação do MGF nos comprimidos revestidos por E UV, E VIS, CLAE, EC e ensaio microbiológico;
- Realizar análise estatística comparativa entre os métodos propostos;
- Desenvolver e validar teste de dissolução com base em dados *in vivo* para comprimidos revestidos de MGF;
- Realizar estudo da estabilidade térmica, química e fotoquímica da SQR e dos comprimidos de MGF;
- Isolar e elucidar estruturalmente o(s) produto(s) de degradação majoritário(s) do MGF, por meio de espectrometria de massas (EM), RMN de ^1H , ^{13}C e correlação (COSY, HSQC e HMBC) e E IV;
- Realizar estudos de citotoxicidade, fototoxicidade, genotoxicidade e fotogenotoxicidade do fármaco MGF, uma impureza de síntese e um produto de degradação isolado.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Histórico das quinolonas

As quinolonas constituem na atualidade, juntamente com os beta-lactâmicos, os fármacos antimicrobianos de maior utilização. A classe de fármacos é classificada em gerações de acordo com o espectro de ação e propriedades farmacocinéticas. As quinolonas de primeira geração apresentam um espectro de ação limitado a bacilos Gram-negativos e, com isso, são utilizadas apenas para infecções do trato urinário. A introdução de um átomo de flúor na posição 6 permitiu a síntese das fluorquinolonas, melhorando atividade farmacocinética e a atividade contra bacilos Gram-negativos, porém com pouca atividade contra Gram-positivos e anaeróbios, como por exemplo, o fármaco norfloxacino. Quinolonas de terceira geração, como o ciprofloxacino e o levofloxacino, apresentam melhor atividade contra Gram-positivos (CALVO e MARTINEZ, 2009).

A introdução do grupamento pirrolidina nas quinolonas proporcionou o surgimento da quarta geração. Os fármacos apresentam uma melhora significativa na atividade contra micro-organismos Gram-positivos, incluindo *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, em comparação com substituinte piperazina. Como exemplo dessa nova geração, o MGF apresenta no anel pirrolidina substituintes aminometila e metoxiimino (HONG *et al.*, 1997).

O fármaco gemifloxacino foi sintetizado pelo Instituto de Pesquisa Biotech da Coreia do Sul a partir da molécula do análogo quinolônico tosufloxacino. Posteriormente, foi licenciado para a SmithKline Beecham, a qual foi responsável pelos Ensaios Clínicos de Fases II e III para colocação do fármaco no mercado. A ideia da síntese foi substituir o grupamento aminobicíclico da posição C7 do anel naftiridina do fármaco tosufloxacino por um grupamento 3-aminopirrolidina e, com isso, proporcionar a síntese de um novo fármaco com melhor atividade antibacteriana e melhor perfil toxicológico. Além disso, a inserção do grupamento metoxiimino no anel pirrolidina, grupamento funcional muito estável, possibilitou ao fármaco realizar pontes de hidrogênio com a enzima DNA girase (DANESHTALAB, 2006).

3.2. Relação estrutura–atividade das quinolonas

A utilização de um grupamento ciclopropila substituindo o nitrogênio do anel na posição 1 (Figura 3.1) promove melhor atividade contra bactérias Gram-negativas e tem sido extensivamente empregada. A utilização de um anel ligando as posições 1 e 8 foi inicialmente utilizada, porém, não apresentou bons resultados. No entanto, no desenvolvimento do ofloxacino, levofloxacino e rufloxacino foi utilizado o mesmo anel de ligação e a atividade melhorou. No decorrer do desenvolvimento e síntese de novas quinolonas, nota-se que modificações são raramente realizadas nas posições 2 (H), 3 (COOH) e 4 (oxigênio exocíclico). As posições 3 e 4 são relacionadas com a ligação da molécula à enzima DNA girase bacteriana, devido a isso, modificações nessa porção da molécula não são recomendadas. Bem como, na posição 2, onde a inserção de grupamentos químicos, devido à proximidade das posições 3 e 4, também não é recomendada (APPELBAUM e HUNTER, 2000).

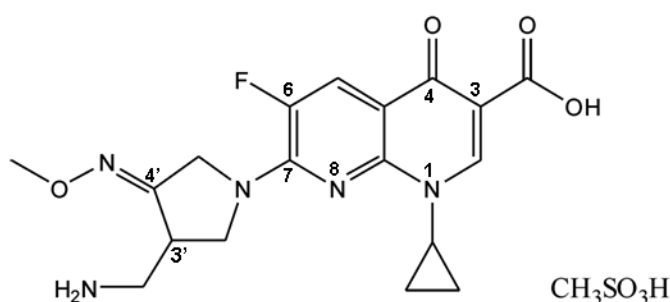


FIGURA 3.1. Estrutura química de MGF

Substituintes na posição 5 influenciam na atividade do fármaco contra bactérias Gram-positivas, mesmo que essa atividade também seja marcadamente influenciada por substituintes em outras posições. No entanto, a presença de substituintes volumosos irá interferir espacialmente com os sítios de ligação do fármaco nas posições 3 e 4, prejudicando sua atividade (APPELBAUM e HUNTER, 2000).

A posição 7 está relacionada com alterações na potência dos fármacos. Anéis contendo nitrogênio heterocíclico apresentam melhor atividade e influenciam na farmacocinética dos fármacos. Grupamentos 7-aminopirrolidina conferem melhor atividade contra bactérias Gram-positivas em comparação com grupamentos 7-piperazina. O fármaco MGF apresenta grupamentos 3-aminometila e 4-metoxiimino

substituintes no anel pirrolidina, combinação de um anel de cinco membros com cadeia lateral curta no grupo oximino, que confere alta atividade contra bactérias Gram-positivas (APPELBAUM e HUNTER, 2000).

Derivados quinolônicos contendo cloro ou flúor na posição 8, embora apresentem melhor atividade, estão associados com casos de fototoxicidade (APPELBAUM e HUNTER, 2000).

3.3. Indicações

O fármaco MGF é indicado em infecções do trato respiratório pela habilidade de se concentrar em fluidos e tecidos desse sistema em concentrações superiores aos níveis séricos (ZHANEL e NOREDDIN, 2001). É utilizado em exacerbação aguda da bronquite crônica causada por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae* ou *Moraxella catarrhalis* e pneumonia adquirida da comunidade causada por *Streptococcus pneumoniae* (incluindo cepas resistentes), *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* ou *Klebsiella pneumoniae* (GROSSMAN *et al.*, 2005; FDA, 2008). Além dessas indicações, estudos têm demonstrado a eficácia da utilização do fármaco no tratamento da sinusite bacteriana aguda. A posologia do fármaco é de um comprimido ao dia, durante cinco ou sete dias, dependendo do micro-organismo responsável pela infecção (ANON e TILLOTSON, 2008).

3.4. Atividade farmacológica

Estudo realizado por KAYS e colaboradores (2007) demonstrou ótima atividade do MGF em isolados de *Streptococcus pneumoniae* coletados em hospital de Indianápolis (EUA), indicando resistência de apenas 1,4%. A concentração inibitória mínima, determinada no mesmo estudo, para provocar a morte de 90% (CIM₉₀) das bactérias foi de 0,03 µg/ml. Estudos de JONES (2002) apresentaram resultados semelhantes com valores de CIM₉₀ na faixa de 0,03 µg/ml a 0,06 µg/ml. O

fármaco MGF apresentou potência 30 vezes superior ao ciprofloxacino e 8 vezes superior ao moxifloxacino frente a este micro-organismo (LOWE e LAMB, 2000).

Em relação ao micro-organismo *Haemophilus influenzae*, os valores encontrados de CIM₉₀ para MGF estiveram na faixa de 0,004 µg/ml a 0,016 µg/ml, inferiores a outras quinolonas testadas. Estudos comparativos *in vitro* demonstraram excelente atividade de uma série de fluorquinolonas para *Moraxella catarrhalis*, nos quais o fármaco MGF apresentou valores de CIM₉₀ na faixa de 0,004 µg/ml a 0,015 µg/ml (JONES, 2002).

3.5. Farmacodinâmica e farmacocinética

O MGF atua inibindo a síntese de DNA bacteriano, através da inibição das enzimas DNA girase e topoisomerase IV (TOPO IV), as quais são essenciais nos processos de replicação, transcrição, recombinação e reparação do DNA bacteriano (FDA, 2008).

A biodisponibilidade do fármaco após administração oral em voluntários sadios é de aproximadamente 71% e é limitada mais significativamente pela absorção do que pelo metabolismo de primeira passagem. Após administração de uma dose oral simples, as concentrações séricas máximas são geralmente observadas entre 0,5 e 2 horas e o fármaco apresenta uma boa penetração nos tecidos e fluidos pulmonares, confirmando suas indicações terapêuticas. Devido à farmacocinética favorável, o medicamento é administrado somente uma vez ao dia (FDA, 2008).

A eficácia antibacteriana de um fármaco pode ser determinada em função da concentração do mesmo no local da infecção em função do tempo. De acordo com isso, modelos que interpretem parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos promovem informações clínicas mais relevantes sobre a eficácia de determinado fármaco (DALHOFF e SCHIMITZ, 2003).

A determinação do parâmetro farmacocinético / farmacodinâmico (PK/PD) área sob a curva (ASC) / CIM para algumas quinolonas, utilizando isolados clínicos

de *Streptococcus pneumoniae*, demonstrou que o fármaco MGF apresentou os resultados mais significativos, demonstrando efeito bactericida e eficácia superiores aos outros fármacos estudados (LI *et al.*, 2007). Resultados semelhantes foram publicados por SARAVOLTZ e colaboradores (2005), no qual o fármaco também apresentou alta eficácia contra isolados clínicos da mesma bactéria.

Estudos de RAMJI e colaboradores (2001) para o fármaco MGF, sintetizado como mistura racêmica (*R* e *S*), demonstraram que ambos os isômeros quirais apresentaram perfis farmacocinéticos muito similares em ratos e cachorros utilizando como método CLAE quiral acoplada à detector de massas. No entanto, estudos descrevendo a atividade do fármaco nos isômeros quirais isolados não foram encontrados na literatura.

3.6. Reações adversas

Os principais efeitos adversos relacionados com o MGF são: diarreia, *rash*, náusea, dor de cabeça, dores estomacais, vômitos e tonturas. Em relação ao potencial de fototoxicidade, característico de algumas quinolonas, essas reações foram raramente relatadas nos estudos clínicos com gemifloxacino (0,039%) (BALL *et al.*, 2004; FDA, 2008).

3.7. Descrição do fármaco

O fármaco mesilato de gemifloxacino apresenta as seguintes características:

- Nome químico: mesilato de (*R,S*)-7-[(4*Z*)-3'-(aminometila)-4'-(metoxiimino)-1-pirrolidinil]-1-ciclopropil-6-flúor-1,4-diidro-4-oxo-1,8-naftiridina-3-carboxílico (FDA, 2008);
- O fármaco apresenta-se como uma mistura racêmica dos enantiômeros *R* e *S* e na estrutura química também verifica-se um isômero geométrico (isômero *Z*) (FDA, 2008);
- Descrição: pó branco ou levemente marrom (FDA, 2008);

- Fórmula molecular: $C_{18}H_{20}FN_5O_4 \cdot CH_4O_3S$ (FDA, 2008);
- Massa molecular: 485,49 (FDA, 2008);
- Faixa de fusão: 201,2 – 205,4 °C (LG Life Sciences, 2008);
- Solubilidade: muito pouco solúvel em pH neutro (350 µg/ml à 37 °C) e solúvel em água (HONG, 2001);
- pKa: pK_{a1} : 6,5 do grupamento piridina-3-ácido carboxílico (LANDERSDORFER *et al.*, 2009) e pK_{a2} : 8,9 da amina primária (KIM *et al.*, 2004).

3.8. Determinação quantitativa

A validação de um método analítico é o processo pelo qual se estabelece, através de estudos laboratoriais, se os parâmetros de desempenho analítico atendem às exigências para a aplicação analítica pretendida. Os estudos para validação dos métodos analíticos devem ser realizados de acordo com os principais Códigos Oficiais, avaliando os seguintes parâmetros de desempenho analítico: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, robustez, e, quando aplicáveis, limites de detecção e de quantificação (BRASIL, 2003, ICH, 2005a; USP 34, 2011).

3.8.1. Espectrofotometria na região do ultravioleta (E UV) e do visível (E VIS)

A E UV/VIS é um método muito utilizado no controle de qualidade de produtos farmacêuticos pelo potencial da grande maioria dos fármacos de absorver energia nessas regiões. Na literatura pesquisada, em relação ao MGF são descritos métodos de reação por complexação com transferência de carga utilizando iodo, derivado benzoquinona, cianoquinodimetano e tetracianoetileno (KRISHNA e SANKAR, 2008a), formação de complexos por pareamento iônico utilizando safranina, azul de metileno, azul de naftol e azocaramina com extração com solvente

orgânico (KRISHNA e SANKAR, 2008b) e complexação com Fe (III) (SUGUMARAN *et al.*, 2008).

3.8.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica de separação fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, a fase móvel, líquida, e a fase estacionária sólida, contida em uma coluna cilíndrica (FB 5, 2010). A possibilidade de variação dos mecanismos de separação pela adequada escolha da coluna, fase móvel e método de detecção, permite a utilização da CLAE nas mais diversas fases do estudo de produtos farmacêuticos e a validação de métodos seletivos para a presença de impurezas e produtos de degradação (ICH, 2003; AHUJA, 2007; ALSANTE *et al.*, 2007).

Em relação à quantificação de MGF em fluidos biológicos, a literatura pesquisada descreve métodos acoplados de CLAE e espectrometria de massas (EM) (DOYLE *et al.*, 2000; ALLEN *et al.*, 2001; ROBLEDO e SMITH, 2008).

A quantificação do fármaco em comprimidos revestidos foi publicada recentemente por RANJANE e colaboradores (2010). O método indicador de estabilidade por CLAE utiliza coluna C8, fase móvel constituída de tampão fosfato de potássio monobásico 10 mM pH 3,0 e acetonitrila (65:35), vazão de 1,0 ml/minuto e detecção UV a 273 nm. A CLAE para quantificação do fármaco também foi descrita por TAVARES e colaboradores (2011), utilizando água, tetraidrofurano e trietilamina (75:25:0,5), ajustada para pH 3,0, como fase móvel e coluna C8.

3.8.3. Ensaio microbiológico

O ensaio microbiológico tem a capacidade de determinar a potência ou atividade de um produto contendo antibiótico comparando a dose que inibe o crescimento de um micro-organismo suscetível em relação à dose de uma substância padrão ou preparação biológica de referência do antibiótico que produz inibição similar (FB 5, 2010).

A utilização do ensaio microbiológico é um dos métodos de escolha para avaliação e determinação da potência de antibióticos (FB 5, 2010). A técnica de difusão em ágar – cilindros em placa é a mais empregada para quantificação das fluorquinolonas, utilizando, principalmente, *Staphylococcus epidermidis* como micro-organismo teste. As concentrações de inóculo e das soluções amostra e padrão são variáveis em função da potência dos fármacos (FRÖEHLICH e SCHAPOVAL, 1990; FRATINI, 1993; SOUZA, 1995; EV, 1997; MARONA e SCHAPOVAL, 1998; BONILLA *et al.*, 2005). No entanto, não existem trabalhos publicados sobre a quantificação de MGF utilizando o ensaio microbiológico.

3.8.4. Eletroforese capilar (EC)

A Eletroforese capilar (EC) é um método físico de análise baseado na migração, dentro de um capilar, de solutos carregados, dissolvidos em uma solução eletrolítica, sob a influência de uma corrente elétrica. Atualmente, a EC compreende uma família de técnicas de separação eletrocínéticas que separam compostos baseada, sobretudo, na diferença de mobilidade eletroforética, partição entre fases, ponto isoelétrico, tamanho molecular, ou ainda, na combinação de uma ou mais destas propriedades (FB 5, 2010).

A literatura pesquisada apresenta alguns artigos científicos descrevendo a quantificação de quinolonas por EC pelo método de zona livre (RUIZ *et al.*, 1999; FIERENS *et al.*, 2000; BÉLTRAN *et al.*, 2004; MICHALSKA *et al.*, 2004; ELBASHIR *et al.*, 2008). A Tabela 3.1 apresenta alguns exemplos das condições eletroforéticas utilizadas nos ensaios.

TABELA 3.1. Condições eletroforéticas descritas para determinação quantitativa de quinolonas

Parâmetro	FIERENS e colaboradores, 2000	MICHALSKA e colaboradores, 2004	ELBASHIR e colaboradores, 2008
Fármacos	Quinolonas de 1 ^o e 2 ^o gerações	Ciprofloxacino e impurezas	Gemifloxacino e lomefloxacino
Eletrólito	Tampão fosfato 125 mM (pH 7,0)	Tampão fosfato e pentanosulfonato de sódio (pH 6,0)	Tampão fosfato 25 mM (pH 8,5)
Solução diluente	Tampão fosfato 125 mM (pH 7,0)	Água : acetonitrila (87:13)	NaOH 0,1 M
Voltagem (kV)	22	15	12
Detecção (nm)	214	254	254

A determinação do fármaco MGF em comprimidos por EC também foi descrita por TAVARES e colaboradores (2011), utilizando tampão tetraborato de sódio 50 mM pH 8,5 como eletrólito e voltagem de 20 kV.

3.9. Teste de dissolução

O teste de dissolução avalia a quantidade de fármaco dissolvido, em um determinado volume de meio, mantido à temperatura de 37 °C ± 0,5 °C, após determinado período, utilizando equipamento com dispositivo para promover agitação do meio em uma determinada velocidade (FB 5, 2010; USP 34, 2011).

Como requisito fundamental na indústria farmacêutica, o teste de dissolução, assegura a qualidade lote a lote do produto farmacêutico no desenvolvimento de novas formulações, garante a qualidade após mudanças na formulação e no processo de produção e avalia a qualidade da formulação em função do tempo e condições de armazenamento durante o período de validade do produto (MARQUES e BROWN, 2002). Devido a isso, o mesmo é exigido pelo FDA para todos os

produtos apresentados como formas farmacêuticas sólidas de uso oral (SHARGEL *et al.*, 2005).

No entanto, o teste de dissolução pode ser ainda mais atrativo se as condições validadas simularem o perfil *in vivo* do fármaco, ou seja, existir uma correlação significativa entre a porcentagem dissolvida do fármaco no teste *in vitro* e porcentagem absorvida do fármaco *in vivo*, sendo úteis no desenvolvimento de formulações e indicativos do perfil de biodisponibilidade (FDA, 1997; DRESSMAN *et al.*, 1998).

A literatura pesquisada apresenta as condições descritas pela FDA (2011) para o registro do produto, sem indicações do método para a quantificação do fármaco, utilizando HCl 0,01 M como meio de dissolução e pás a 50 rpm. BALAJI e colaboradores (2010) validaram essas mesmas condições utilizando o método por E UV para quantificação do teor dissolvido. No entanto, a literatura não faz referência ao desenvolvimento de um teste de dissolução com condições que possam simular o perfil de absorção *in vivo*, ou seja, determinar uma correlação *in vitro - in vivo* (CIVIV) do fármaco.

3.10. Determinação de impurezas e estudos de segurança biológica

De acordo com os Guias regulatórios do ICH (Q3C, 2005b; Q3A, 2006a; Q3B, 2006b), as impurezas presentes em produtos farmacêuticos podem ser classificadas em três categorias: orgânicas, inorgânicas e solventes residuais. Dentro dessas podem ser consideradas impurezas: materiais de partida, isômeros produzidos durante a síntese, produtos intermediários (reagentes, solventes, materiais de catálise), impurezas de excipientes, produtos de reações, impurezas formadas pela interação fármaco e excipiente e produtos de degradação.

O Guia do ICH Q3A (2006a), especifica o limite de impurezas permitido de acordo com a dose diária do fármaco. Em relação ao MGF, com dose diária de 320 mg, se o limite de impurezas for inferior a 0,05%, não é necessário relatar, identificar (elucidar estruturalmente) ou qualificar (estudos de segurança biológica) essas impurezas para o pedido de registro do produto farmacêutico. No entanto, se

a porcentagem for superior a 0,05% é necessário realizar o relato. A elucidação estrutural deverá ser realizada quando o limite de impurezas for igual ou superior a 0,1% ou a dose diária resultar em administração de 1 mg da impureza. A realização de estudos de segurança biológica das impurezas torna-se necessária se na determinação quantitativa forem encontrados teores iguais ou superiores a 0,15% ou a ingestão diária for superior a 1 mg da impureza.

O Guia ICH Q3B (2006B) refere-se aos limites preconizados para produtos de degradação do fármaco ou produtos formados pela reação do fármaco com excipientes ou substâncias da embalagem. Nestas condições, a elucidação estrutural deverá ser realizada quando o limite dos mesmos for igual ou superior a 0,2% ou a dose diária resultar em administração de 2 mg da impureza. Os estudos de segurança biológica das impurezas tornam-se necessários quando forem encontrados teores iguais ou superiores a 0,2% ou ingestão diária for superior a 3 mg. De acordo com o Guia devem ser realizados estudos de toxicidade geral em uma espécie roedora em um período de 14 a 90 dias e estudos de genotoxicidade para verificação de mutações ou aberrações cromossômicas.

A segurança de um produto farmacêutico não está apenas relacionada com as propriedades farmacológicas do ingrediente ativo, mas também das impurezas que o mesmo contém. Diante disso, a identificação, a quantificação e o controle das impurezas em fármacos e produtos acabados são de suma importância, pois esses produtos podem estar relacionados com reações adversas e efeitos farmacológicos tóxicos (ICH Q3A, 2006a; ICH Q3B, 2006b; BASAK, 2007).

No entanto, a literatura pesquisada não apresenta estudos publicados de determinação do perfil de impurezas do fármaco MGF, com exceção do trabalho de GANDHIMATHI e colaboradores (2010) discutido no item 3.11, onde os autores sugerem a identificação de produtos de degradação formados em diferentes condições de estresse.

3.11. Estabilidade - Isolamento e identificação de produtos de degradação

O teste de estabilidade fornece informações sobre como a qualidade da matéria-prima ou mesmo do produto acabado variam frente a diversos fatores, como, por exemplo, temperatura, umidade, luz, reações de hidrólise e oxidação (KOMMANABOYINA e RHODES, 1999). Além disso, a estabilidade depende das propriedades físicas, químicas e físico-químicas dos fármacos, excipientes e embalagens utilizados (MATTHEWS, 1999). As reações de degradação de um produto farmacêutico ocorrem em velocidades definidas, são de natureza química e dependem de várias condições, como, por exemplo, concentração dos reagentes, temperatura, pH, radiação ou presença de catalisadores.

Em relação à estabilidade da classe das quinolonas, a literatura menciona trabalhos relacionados ao potencial de fotodegradação (EV, 1997; TORNIAINEN *et al.*, 1997; ENGLER *et al.*, 1998; LOVDAHL e PRIEBE, 2000; MARONA, 2000; SUNDERLAND *et al.*, 2001; BONILLA, 2004). ENGLER e colaboradores (1998) e LOVDAHL e PRIEBE (2000) verificaram a perda dos átomos de flúor e cloro na posição 8 de clinafloxacino e esparfloxacino, respectivamente. A fotodegradação do fármaco ciprofloxacino em meio ácido provocou modificações somente no anel piperazina, presente na molécula do fármaco (TORNIAINEN *et al.*, 1997).

Conforme PICÓ e ANDREU (2007), a maioria das fluorquinolonas é estável em condições hidrolíticas, porém TORNIAINEN e colaboradores (1996 e 1997) demonstraram que a fotodegradação do ciprofloxacino é influenciada pelo pH da solução, provocando modificações no anel piperazina do fármaco. Outros estudos mostraram que a associação de condições hidrolíticas (ácidas ou alcalinas) e térmicas também podem provocar a degradação, como descrito para o esparfloxacino por MARONA (2000).

Estudos demonstrando a estabilidade térmica são descritos para o pefloxacino e ofloxacino (SOUZA, 1995; EV 1997). FRÖEHLICH (1991) verificou aproximadamente 10% de degradação do fármaco norfloxacino em comprimidos, a 60 °C durante 90 dias, utilizando o ensaio microbiológico para determinação quantitativa. Em relação a estudos de estabilidade em condições oxidativas, com peróxido de hidrogênio, EV (1997) demonstrou a degradação do ofloxacino em

solução injetável. A degradação de ciprofloxacino também foi descrita em meio oxidativo e alcalino com permanganato de potássio (THABAJ *et al.*, 2007).

GANDHIMATHI e colaboradores (2010) sugerem a identificação de produtos de degradação de MGF obtidos em condições hidrolíticas ácida, básicas e oxidativas por CLAE-EM. No entanto, o artigo apenas sugere a identificação destes produtos baseado em dados da massa molecular dos compostos, sem a realização dos ensaios complementares de elucidação estrutural por RMN e E IV.

**4. CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE
REFERÊNCIA (SQR) DE MESILATO DE GEMIFLOXACINO (MGF)**

4.1. Introdução

De acordo com a definição da Organização Mundial de Saúde (OMS), padrões de referência farmacopeicos são produtos de uniformidade reconhecida, destinados ao uso em ensaios onde uma ou mais de suas propriedades será(ão) comparada(s) com a(s) da substância em exame FB 5 (2010).

A pureza desses produtos é de fundamental importância para o controle de qualidade e a validação de métodos analíticos. Conforme a FDA, existem duas categorias de SQR: compendiais e não-compendiais. As SQR compendiais são aquelas adquiridas de fontes comerciais reconhecidas (FB e USP) e não necessitam de caracterização posterior e as SQR não-compendias são aquelas com elevado teor de pureza, entretanto necessitam ser cuidadosamente caracterizadas (SWARTZ e KRULL, 1998). Diante disso, objetivou-se a caracterização das SQR de MGF utilizadas nesses estudos.

4.2. SQR de MGF

SQR de MGF, gentilmente cedida pela Indústria Oscient Pharmaceuticals (Massachusetts, Estados Unidos), com teor declarado de 99,0% e SQR de MGF adquirida da Toronto Research Chemical (TRC, Ontario, Canadá), com teor declarado de 99,0%.

4.3. Parte Experimental

4.3.1. Caracterização da SQR de MGF

Os procedimentos de caracterização foram realizados com a SQR de MGF cedida pela Indústria Oscient Pharmaceuticals. Ensaios de determinação quantitativa foram posteriormente realizados com a SQR de MGF adquirida da TRC.

Utilizaram-se as seguintes técnicas para caracterização da SQR de MGF: análise térmica por calorimetria exploratória de varredura (DSC), faixa de fusão,

espectrofotometria na região do infravermelho (E IV) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono (RMN ^{13}C).

4.3.1.1. Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As análises foram realizadas em calorímetro diferencial exploratório por fluxo de calor, Shimadzu DSC-60, dotado de controlador de fluxo para gás de purga (N_2) FC-60-A, integrador TA-60WS e software de controle e análise TA-60 versão 2.0.

Para realizar o ensaio, transferiu-se, aproximadamente 1,0 mg da SQR de MGF para portas-amostra de alumínio com capacidade de 4 μl , as quais foram seladas e colocadas no forno do calorímetro exploratório de varredura. A rampa de aquecimento utilizada foi de 5 $^\circ\text{C}/\text{minuto}$ e as análises foram realizadas com e sem prévio aquecimento para evaporação da água de hidratação.

4.3.1.1.1. Resultados e discussão

A Figura 4.1 apresenta a curva de aquecimento obtida por DSC para MGF SQR sem prévio aquecimento.

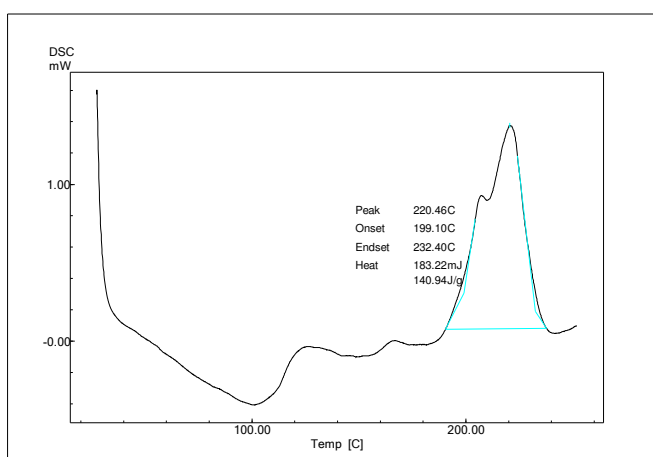


FIGURA 4.1. Curva sem prévio aquecimento obtida por DSC para a SQR de MGF em atmosfera de nitrogênio e taxa de aquecimento de 5 $^\circ\text{C}/\text{minuto}$.

A Figura 4.2 apresenta a curva obtida por DSC para MGF SQR com prévio aquecimento para retirar a água de hidratação da molécula.

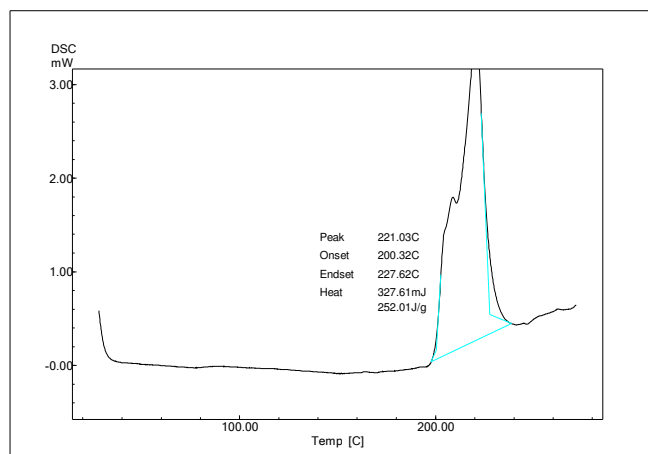


FIGURA 4.2. Curva com prévio aquecimento (110 °C) obtida por DSC para a SQR de MGF em atmosfera de nitrogênio e taxa de aquecimento de 5 °C/minuto.

De acordo com as curvas de aquecimento obtidas nas duas situações referidas acima (sem prévio aquecimento e com prévio aquecimento a 110 °C) verifica-se que não ocorreu uma faixa de fusão bem definida devido à decomposição da substância durante a fusão, o que não permite a determinação da pureza utilizando esse método analítico (MATHKAR *et al.*, 2009; MATOS *et al.*, 2009). Assim sendo, a DSC não pode ser considerada uma ferramenta adequada para determinação da faixa de fusão da SQR de MGF.

4.3.1.2. Faixa de fusão pelo método do capilar

As análises pelo método do capilar foram realizadas em equipamento Mettler Toledo, FP 90, previamente calibrado. A amostra foi compactada em tubo capilar com diâmetro de 1 mm e 6 cm de comprimento.

4.3.1.2.1. Resultados e discussão

Os resultados obtidos para ponto de fusão: 202,3 °C, 209,3 °C e 212,8 °C foram extremamente variáveis. Esses valores não foram semelhantes aos referenciados pela bibliografia pesquisada para faixa de fusão (201,2 °C a 205,4 °C), descrito por LG LIFE SCIENCES (2008). A diferença obtida deve-se ao fundamento da metodologia, o qual se mostra inadequado para determinação da faixa de fusão de substâncias que decompõem durante a fusão. Essa decomposição foi verificada pelo escurecimento da amostra dentro do capilar.

4.3.1.3. Faixa de fusão utilizando microscópio de ponto de fusão tipo Kofler

As análises foram realizadas em equipamento ponto de fusão tipo Kofler, marca Wagner & Muniz.

4.3.1.3.1. Resultados e discussão

A faixa de fusão média obtida foi de 200,8 a 204,1 °C (n = 3), os quais foram semelhantes aos referenciados pela literatura (201,2 °C a 205,4 °C; LG LIFE SCIENCES, 2008). O resultado demonstrou a adequabilidade do método utilizando equipamento tipo Kofler para determinação da faixa de fusão do MGF.

4.3.1.4. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (E IV)

A caracterização da SQR de MGF por E IV foi realizada por meio da preparação de uma pastilha contendo 1,5 mg da SQR de MGF e 150 mg de brometo de potássio (KBr), em espectrofotômetro infravermelho PerkinElmer, modelo Spectrum BX.

4.3.1.4.1. Resultados e discussão

O espectro na região do IV da SQR de MGF em pastilha de KBr, na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} , está apresentado na Figura 4.3.

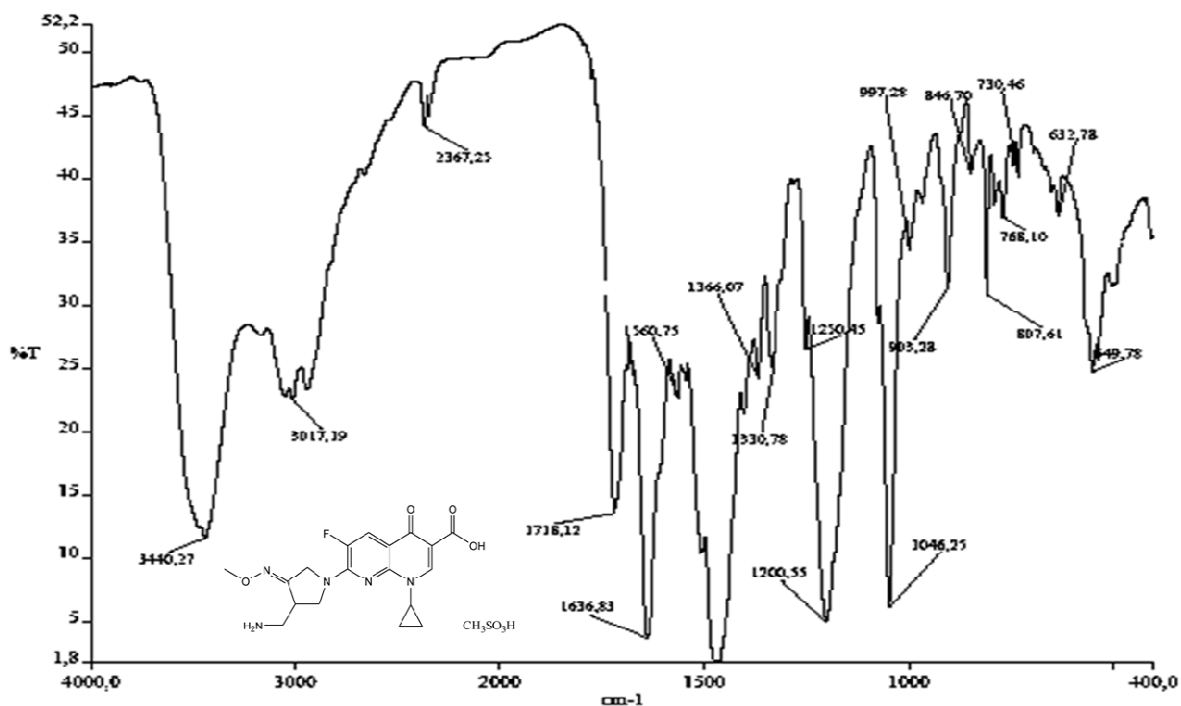


FIGURA 4.3. Espectro de absorção na região do IV da SQR de MGF em pastilha de KBr.

A identificação das bandas de absorção dos principais grupamentos químicos presentes na molécula de MGF encontra-se descrita na Tabela 4.1.

TABELA 4.1. Frequências de absorção das principais bandas de absorção de MGF e suas respectivas atribuições

Frequência (cm ⁻¹)	Atribuição
3440	Deformação axial de OH de ácido carboxílico, da água de hidratação e de NH ₂
3017 e 2960	Deformação axial de C-H
1718	Deformação axial de C=O de ácido carboxílico
1636	Deformação axial da cetona (C=O) em C4
1475	Deformação axial de CH ₂ da ciclopropila
1200	Deformação axial de C-O de ácido carboxílico
1046	Estiramento simétrico de S=O

Os resultados encontrados estão de acordo com as atribuições esperadas para a molécula de MGF, com base nos resultados de atribuições descritos na literatura para outras quinolonas (MARONA, 2000), bem como para esses grupamentos químicos (PAVIA et al., 2001; STUART, 2004).

4.3.1.5. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e de carbono (RMN ¹³C)

Os espectros de RMN ¹H e de RMN ¹³C da SQR de MGF foram realizados em equipamento Bruker, modelo DPX 400 MHz, utilizando dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆) como solvente.

4.3.1.5.1. Resultados e discussão

O espectro de RMN ¹H e a estrutura química de MGF estão apresentados na Figura 4.4.

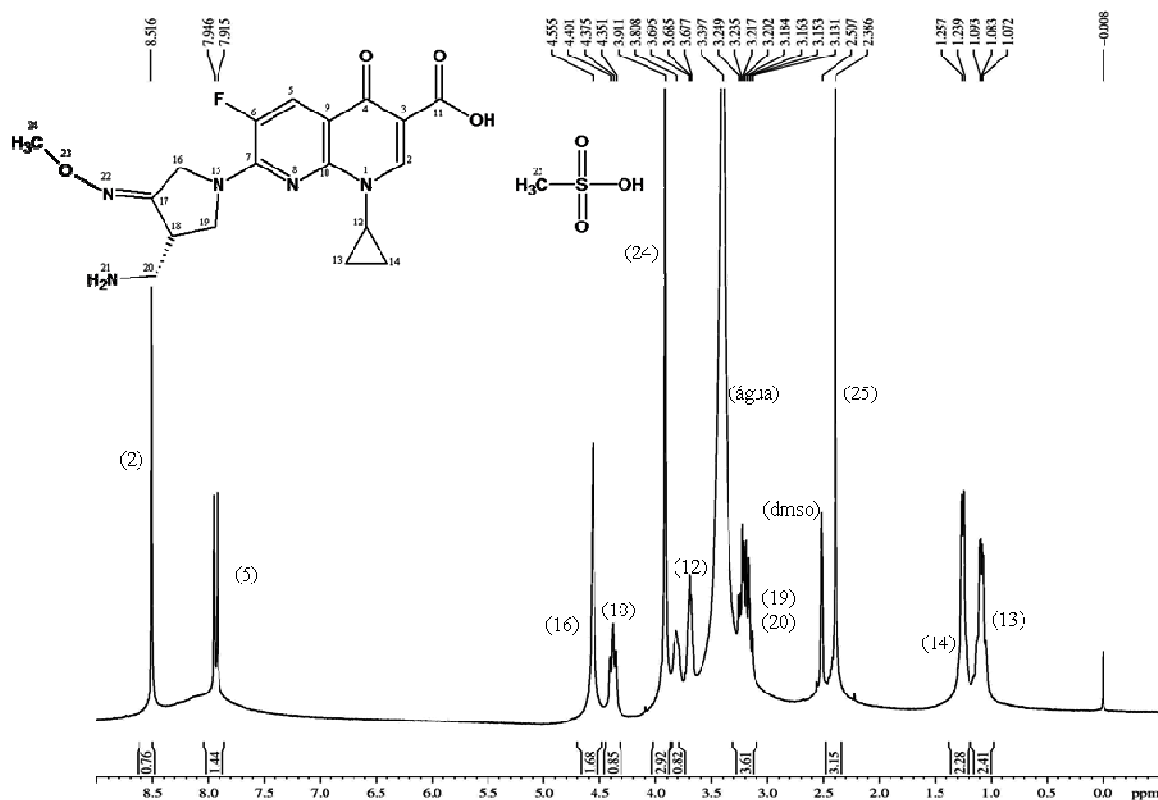


FIGURA 4.4. Espectro de RMN ^1H em DMSO_{d6} da SQR de MGF e respectiva estrutura química com as atribuição dos sinais.

As atribuições do espectro de RMN ^1H estão apresentadas na Tabela 4.2.

TABELA 4.2. Atribuições do espectro de RMN ^1H do MGF em DMSO_{d6}

Posição	Deslocamento químico (ppm)	Multiplicidade	Número de hidrogênios	Interpretação
2	8,516	singleto	1	H do C 2 (anel aromático)
5	7,915 – 7,946	duplo dubleto	1	H do C 5 (anel aromático)
16	4,555	singleto	2	2H do anel pirrolidina
18	4,351 – 4,401	duplo dubleto	1	1H do anel pirrolidina
24	3,911	singleto	3	3H (CH_3) do metoxila
12	3,677 – 3,695	multipleto	1	1H (CH) da ciclopropila
água	3,397	-	-	H_2O do DMSO e de hidratação
19 / 20	3,131 – 3,249	multipleto	4	4H do anel pirrolidina
DMSO	2,507	-	-	Solvente DMSO
25	2,386	singleto	3	3H (CH_3) do mesilato
13	1,26	multipleto	2	2H (CH_2) da ciclopropila
14	1,07	multipleto	2	2H (CH_2) da ciclopropila

O espectro de RMN ^{13}C e a estrutura química de MGF estão apresentados na Figura 4.5.

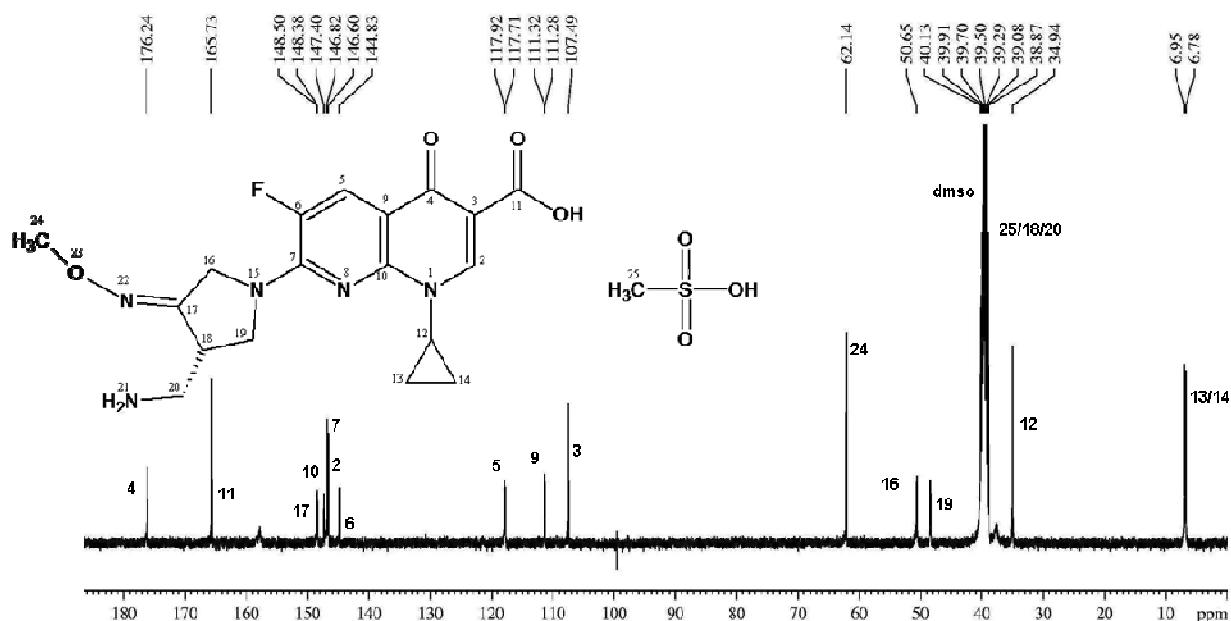


FIGURA 4.5. Espectro de RMN ^{13}C em DMSO-d_6 da SQR de MGF e respectiva estrutura química com as atribuições dos sinais.

As atribuições do espectro de RMN ^{13}C estão apresentadas na Tabela 4.3.

TABELA 4.3. Atribuições do espectro de RMN ^{13}C da SQR de MGF em DMSO-d_6

Carbono	Deslocamento químico (ppm)	Interpretação	Carbono	Deslocamento químico (ppm)	Interpretação
13	6,78	R-CH ₂ -R	5	117,71 / 117,92	C=C (anel aromático)
14	6,95	R-CH ₂ -R	6	144,83	C-F (anel aromático)
12	34,94	R ₃ CH	2	146,60	N=C-N (anel aromático)
25	38,87 – 40,13	C do CH ₃ SOOH (25)	7	147,40	C-N
18		R ₃ -CH (18)	10	148,38	N=C-N
20		C-N (20)	17	148,50	C=N-O
19	48,00	C-N	11	165,73	C=O (ácido carboxílico)
16	50,65	C-N	4	176,24	C=O (cetona)
24	62,14	C-O (metoxila)			
3	107,49	C=C (anel aromático)			
9	111,28 / 111,32	C=C (anel aromático)			

De acordo com a literatura consultada, a interpretação dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C demonstrou que os sinais obtidos estão de acordo com as atribuições esperadas para a molécula de MGF, de acordo com os grupamentos químicos presentes (GOTTLIEB *et al.*, 1997; PAVIA *et al.*, 2001; SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

4.4. Conclusões

- Devido à decomposição da SQR de MGF durante a fusão, a determinação da faixa de fusão pelos métodos de DSC e do capilar não se mostraram adequados;
- A SQR de MGF apresentou faixa de fusão semelhante à preconizada pelo fabricante quando foi utilizado o método tipo Kofler;
- A interpretação do espectro no IV demonstrou que as bandas obtidas estão de acordo com as atribuições esperadas para a molécula de MGF;
- A interpretação do espectro de RMN ^1H e RMN ^{13}C demonstrou que os sinais obtidos estão de acordo com as atribuições esperadas para a molécula de MGF;
- Tendo em vista os resultados obtidos, caracterizou-se a SQR de MGF como adequada para ser utilizada nos estudos propostos neste trabalho.

**5. CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DE MGF EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS**

5.1. Introdução

A identificação de fármacos em produtos acabados é normalmente realizada por meio da aplicação de técnicas cromatográficas (CCD e CLAE) e espectrofotométricas (E UV e VIS).

A CCD é uma técnica de separação que oferece fácil compreensão e execução, separações em breve espaço de tempo, versatilidade e baixo custo (LOPES, 1997). A verificação da seletividade do método proposto pode ser realizada através da aplicação de um fármaco estruturalmente semelhante.

A identificação de fármacos por E UV e E VIS é realizada através da comparação do espectro da solução amostra com o espectro de uma solução padrão do mesmo fármaco em determinada concentração. Além disso, é possível verificar se os produtos apresentam os mesmos comprimentos de onda máximos e mínimos de absorção. Mesmo não sendo um método seletivo, possui ampla aplicação nos Códigos Oficiais (WATSON, 2005).

A CLAE, quando utilizada para identificação de compostos, realiza a comparação entre os tempos de retenção obtidos para o pico da solução amostra e da solução padrão do fármaco. A utilização de detectores de arranjo de fotodiodos permite, além da comparação do tempo de retenção, verificar a similaridade entre os espectros obtidos (FB 5, 2010).

Em relação à EC, a identificação pode ser realizada por meio da comparação dos tempos de migração relativos para o pico da solução amostra e da solução padrão do fármaco em estudo e da verificação da similaridade entre os espectros obtidos.

Objetivou-se o desenvolvimento de métodos para identificação qualitativa de MGF nos comprimidos, pois na literatura pesquisada não foram encontrados relatados descrevendo métodos de identificação.

5.2. Produto Farmacêutico

Comprimidos revestidos de MGF equivalente a 320 mg de gemifloxacino (Factive[®]), fabricados pelo Aché Laboratórios Farmacêuticos S. A., adquiridos no comércio local. Os excipientes presentes na formulação são: crospovidona, celulose microcristalina, hidroxipropilmetilcelulose, estearato de magnésio, polietilenoglicol, povidona e dióxido de titânio (ACHÉ, 2006).

5.3. Parte experimental

5.3.1. Determinação da solubilidade da SQR de MGF

A determinação da solubilidade da SQR de MGF foi realizada para verificar quais solventes poderiam ser utilizados como diluentes nos métodos qualitativos e quantitativos a serem desenvolvidos. Esse ensaio foi realizado conforme descrito na FB 5 (2010), através do método de partes, porém ao invés de pesar 1 g da SQR de MGF, pesou-se 10 mg. Os solventes utilizados para verificação da solubilidade foram: água, etanol, metanol, acetonitrila, ácido clorídrico 0,1 M, e soluções tamponadas de fosfato de potássio monobásico 50 mM pH 4,0, 5,0, 6,0 e pH 7,0 mantidos à temperatura ambiente. Os solventes orgânicos utilizados foram de grau analítico e as soluções reagentes e as soluções tampão foram preparadas de acordo com a USP 34 (2011).

5.3.1.2. Resultados e discussão

Os resultados da determinação da solubilidade à temperatura ambiente da SQR de MGF, realizados conforme o método de partes descrito na FB 5 (2010) estão descritos na Tabela 5.1.

TABELA 5.1. Determinação da solubilidade da SQR de MGF conforme a FB 5 (2010).

Solvente	Solubilidade
Água	Solúvel
Acetonitrila	Insolúvel
Ácido clorídrico 0,1 M	Solúvel
Etanol	Pouco solúvel
Metanol	Pouco solúvel
Tampão fosfato pH 4,0	Praticamente insolúvel ou insolúvel
Tampão fosfato pH 5,0	Praticamente insolúvel ou insolúvel
Tampão fosfato pH 6,0	Muito pouco solúvel
Tampão fosfato pH 7,0	Praticamente insolúvel ou insolúvel

Conforme demonstraram os resultados de solubilidade, a água, ácido clorídrico 0,1 M, etanol e metanol apresentaram solubilidade igual ou superior a 1 mg/ml, sendo considerados adequados para utilização como diluentes do MGF no desenvolvimento e validação dos métodos analíticos qualitativos e quantitativos. No entanto, o fármaco MGF apresentou-se muito pouco solúvel em tampão fosfato pH 6,0 e praticamente insolúvel em outras soluções tamponadas (pH 4,0, pH 5,0 e pH 7,0) à temperatura ambiente.

5.3.2. Cromatografia em camada delgada (CCD)

5.3.2.1. Condições cromatográficas

As soluções da SQR de MGF, da amostra de MGF nos comprimidos revestidos e da SQR de cloridrato de ciprofloxacino (Figura 5.1) foram preparadas em metanol na concentração de 0,1 mg/ml. As soluções foram mantidas em ultrassom por 15 minutos, com posterior filtração da solução amostra dos comprimidos de MGF.

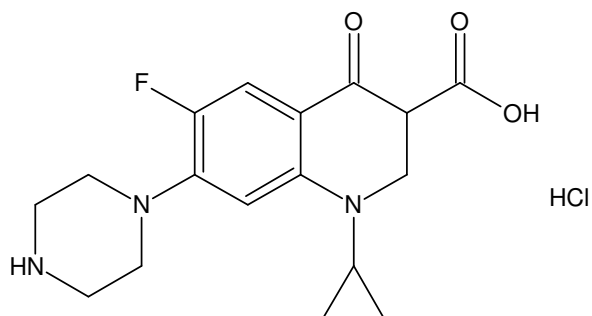


FIGURA 5.1. Estrutura química de cloridrato de ciprofloxacino.

O desenvolvimento cromatográfico foi realizado em placas cromatográficas aluminizadas de sílica-gel 60 F₂₅₄ (Merck). Após as aplicações das soluções, as placas foram transferidas para cubas, previamente saturadas com o sistema eluente, constituído de uma mistura de butanol, água, hidróxido de amônio e acetona (10:15:15:60, v/v). Desenvolveu-se o cromatograma e realizou-se a visualização das manchas, por meio da exposição das placas à lâmpada UV 254 nm (Vilber Lourmat® 6 LC). Posteriormente, o R_x e os fatores de retenção (R_f) referentes aos fármacos aplicados foram determinados. Os solventes utilizados nesse ensaio foram de grau analítico.

5.3.2.2. Resultados e discussão

O cromatograma obtido por CCD nas condições descritas acima está apresentado na Figura 5.2.

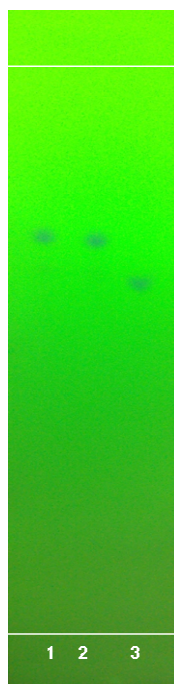


FIGURA 5.2. Cromatograma obtido por CCD na análise da solução da SQR de MGF (1), solução amostra dos comprimidos de MGF (2) e da solução da SQR de cloridrato de ciprofloxacino (3), revelados por radiação UVC. Sistema eluente: butanol, água, hidróxido de amônio e acetona (10:15:15:60, v/v). Suporte: sílica-gel 60 F₂₅₄.

Os valores de R_f obtidos para as soluções da SQR e amostra dos comprimidos de MGF foram de 0,65 e o R_f obtido para a SQR de cloridrato de ciprofloxacino foi de 0,57. O R_x obtido entre o R_f do MGF e o R_f do cloridrato de ciprofloxacino foi de 1,14.

A literatura pesquisada não apresenta testes de identificação por CCD para o fármaco MGF. Desse modo, foram testados os métodos descritos nas Farmacopeias para identificação de quinolonas. O método descrito na monografia da matéria-prima de mesilato de pefloxacino preconizado na Farmacopeia Britânica (BP 2008) foi o que apresentou os melhores resultados. No desenvolvimento do método também foram consideradas a polaridade e a solubilidade do fármaco. A seletividade entre o fármaco MGF e um fármaco análogo da classe das quinolonas foi adequada, demonstrando a aplicabilidade do teste cromatográfico para identificar qualitativamente o fármaco MGF nos comprimidos revestidos.

5.3.3. Espectrofotometria na região do ultravioleta (E UV) e do visível (E VIS)

5.3.3.1. Condições espectrofotométricas para a E UV

Foram traçados espectros de absorção molecular na região do UV das soluções da SQR e dos comprimidos de MGF utilizando água e metanol como diluentes. As análises espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro ultravioleta Shimadzu, modelo UV-160A, utilizando cubetas de quartzo de 10 mm. Todos os procedimentos realizados foram protegidos da luz.

Pesou-se, exatamente a SQR de MGF, equivalente a 10,0 mg de gemifloxacino e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 100 ml com auxílio de metanol ou água, de modo a obter concentração de 100,0 µg/ml de gemifloxacino base. Transferiram-se alíquotas dessas soluções para balões volumétricos, de modo a obter concentrações de 10 µg/ml para determinação em água e de 12 µg/ml para determinação em metanol em gemifloxacino base. O mesmo procedimento foi realizado para a preparação das soluções amostras, porém, anteriormente à diluição, as soluções foram filtradas.

5.3.3.1.1. Resultados e discussão

Os espectros sobrepostos das soluções da SQR e da amostra dos comprimidos de MGF, diluídas em água (10 µg/ml) e metanol (12 µg/ml) estão apresentados na Figura 5.3 e Figura 5.4, respectivamente.

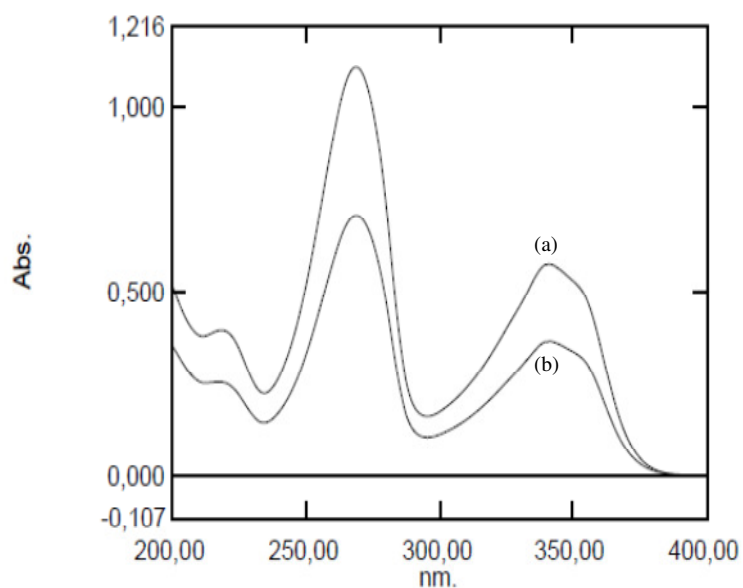


FIGURA 5.3. Espectros sobrepostos na região do UV das soluções da SQR (a) e da solução amostra dos comprimidos (b) de MGF em água a 10 $\mu\text{g/ml}$.

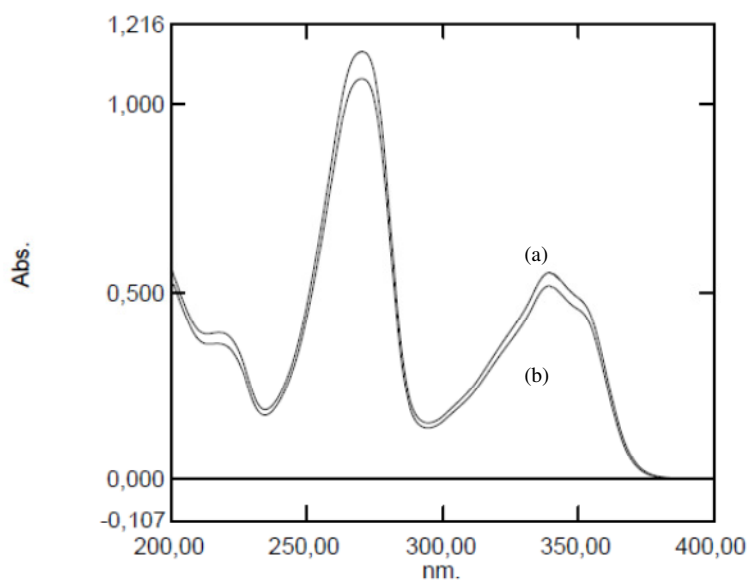


FIGURA 5.4. Espectros sobrepostos na região do UV das soluções da SQR (a) e da solução amostra dos comprimidos (b) de MGF em metanol a 12 $\mu\text{g/ml}$.

Os espectros na região do UV, na faixa de 200 a 400 nm, obtidos para as soluções da SQR de MGF e da amostra dos comprimidos em água (Figura 5.3) apresentaram máximos e mínimos de absorção nos mesmos comprimentos de onda (269 nm e 342 nm), porém com diferenças significativas na intensidade, devido,

provavelmente, às diferenças encontradas no valor de pH das soluções padrão e amostra (5,50 e 6,10, respectivamente), o que provoca uma diferença na ionização do fármaco devido ao pKa do grupamento ácido carboxílico e um efeito hipocrômico na solução amostra de MGF (WATSON, 2005). De acordo com ALBINI e MONTI, (2003), modificações de pH induzem alterações no perfil de absorção da classe das fluorquinolonas, conforme verificado com o fármaco enoxacino. A avaliação da complexação do fármaco MGF com o excipiente estearato de magnésio, presente na formulação dos comprimidos, também foi avaliada. No entanto, resultados demonstraram que o excipiente não interferiu na quantificação da SQR de MGF quando presente em concentração de 5 a 10% na formulação (concentrações superiores ao recomendado como lubrificante em comprimidos).

Os espectros obtidos em metanol (Figura 5.4) apresentaram máximos e mínimos de absorção nos mesmos comprimentos de onda (272 nm e 343 nm) para as soluções da SQR e para a amostra dos comprimidos de MGF. Diante desses resultados, verificou-se a adequabilidade do método desenvolvido utilizando metanol como solvente para identificação de MGF nos comprimidos revestidos por E UV.

5.3.3.2. Condições espectrofotométricas para a E VIS

Pesou-se, exatamente a SQR de MGF, equivalente a 10,0 mg de gemifloxacino e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 100 ml com metanol, de modo a obter concentração de 100,0 µg/ml de gemifloxacino base. Retirou-se uma alíquota de 5,0 ml dessa solução e transferiu-se para funil de separação de 250 ml, adicionou-se 5,0 mL de solução tampão biftalato de potássio 25 mM pH 3,3 (USP 34, 2011), 5,0 ml de solução aquosa de verde de bromocresol 1 mM e homogeneizou-se. Adicionou-se 5,0 ml de clorofórmio e agitou-se por 1 minuto para extração do complexo de par iônico formado. Transferiu-se a camada orgânica para balão volumétrico de 25 ml e realizou-se o procedimento de extração mais três vezes. Completou-se o volume do balão volumétrico com clorofórmio, de modo a obter concentração de 20 µg/ml em gemifloxacino base.

O mesmo procedimento foi realizado para a preparação da solução amostra. Mediu-se a absorvância das soluções a 417 nm em espectrofotômetro UV

Shimadzu, modelo UV-160A, utilizando cubetas de quartzo de 10 mm. Preparou-se uma solução do branco, utilizando 5,0 ml de metanol ao invés das soluções padrão e amostra de MGF. Todo o procedimento realizado foi protegido da luz.

5.3.3.2.1. Resultados e discussão

Os espectros sobrepostos do complexo formado entre as soluções da SQR (a) e da amostra dos comprimidos de MGF (b) e o reagente verde de bromocresol em meio tamponado (pH 3,3) estão apresentados na Figura 5.5.

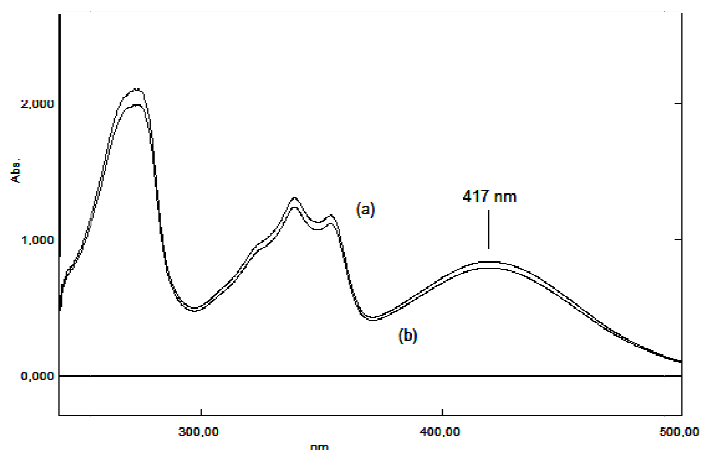


FIGURA 5.5. Espectros sobrepostos na região do UV/VIS do complexo formado entre as soluções da SQR (a) e da solução amostra dos comprimidos (b) de MGF com verde de bromocresol em solução tampão de biftalato de potássio 25 mM pH 3,3.

Os espectros obtidos do complexo formado (Figura 5.5) apresentaram máximos e mínimos de absorção nos mesmos comprimentos de onda, especialmente em 417 nm, comprimento de onda máximo de absorção visível do complexo formado entre o fármaco MGF e o reagente colorimétrico em meio tamponado. Diante desses resultados, verificou-se a adequabilidade do método desenvolvido para identificação de MGF nos comprimidos revestidos por E VIS.

5.3.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

5.3.4.1. Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a líquido Agilent, modelo 1200 Series. As condições cromatográficas definidas para identificação e quantificação de MGF estão apresentadas na Tabela 5.2.

Pesou-se, exatamente a SQR de MGF, equivalente a 10,0 mg de gemifloxacino e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 100 ml com metanol, de modo a obter concentração de 100,0 µg/ml de gemifloxacino base. Transferiu-se uma alíquota de 5,0 ml dessa solução para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com fase móvel, de modo a obter concentração de 20 µg/ml em gemifloxacino base. O mesmo procedimento foi realizado para a preparação da solução amostra, porém anteriormente à diluição a solução foi filtrada.

TABELA 5.2. Condições cromatográficas definidas para identificação e quantificação de MGF nos comprimidos revestidos por CLAE

Parâmetro	Descrição
Fase móvel	Trietilamina 0,3% (v/v) pH 3,0 (ajustado com ácido fosfórico 10%) e acetonitrila (80:20)
Vazão	1,0 ml/min
Coluna	Eclipse [®] XDB C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)
Deteção	272 nm, detector de arranjo de fotodiodos
Temperatura do forno	25 °C
Volume injetado	20 µl

Os componentes da fase móvel foram misturados e filtrados, sob vácuo, através de membrana de *nylon* de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro interno. Após estabilização do sistema, as soluções da SQR e dos comprimidos de MGF, previamente filtradas em membrana de *nylon* Millex[®] 0,45 µm, marca Millipore, foram injetadas no cromatógrafo a líquido. Todo o procedimento realizado foi protegido da luz.

5.3.4.2. Resultados e discussão

Os cromatogramas sobrepostos da SQR de MGF e da solução amostra dos comprimidos de MGF, estão apresentados na Figura 5.6.

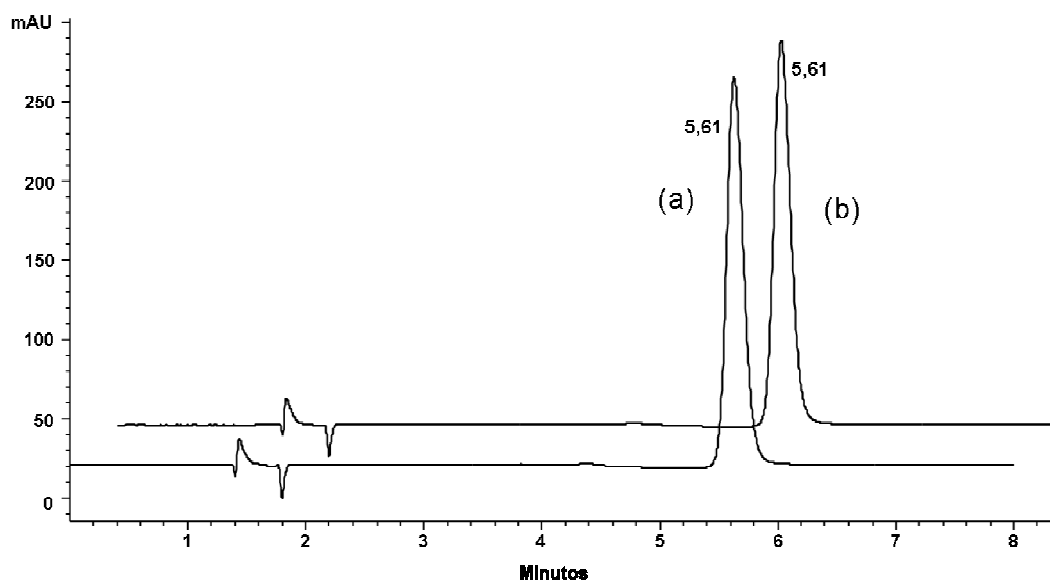


FIGURA 5.6. Cromatogramas sobrepostos da SQR de MGF (a) e da solução amostra dos comprimidos de MGF (b) a 20 $\mu\text{g/ml}$. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de trietilamina 0,3% (v/v) pH 3,0 (ajustado com ácido fosfórico 10%) e acetonitrila (80:20, v/v), vazão de 1,0 ml/min, coluna Eclipse[®] XDB C18 (150 mm x 4,6 mm; 5 μm), detecção em 272 nm, volume de injeção de 20 μl , temperatura de análise de 25 $^{\circ}\text{C}$. Cromatograma (b) propositadamente deslocado.

A Figura 5.7 apresenta os espectros sobrepostos de absorção na região do UV (220 a 400 nm), obtidos em detector de arranjo de fotodiodos, do ápice dos picos de MGF nas soluções da SQR e amostra dos comprimidos, representados no cromatograma acima (Figura 5.6).

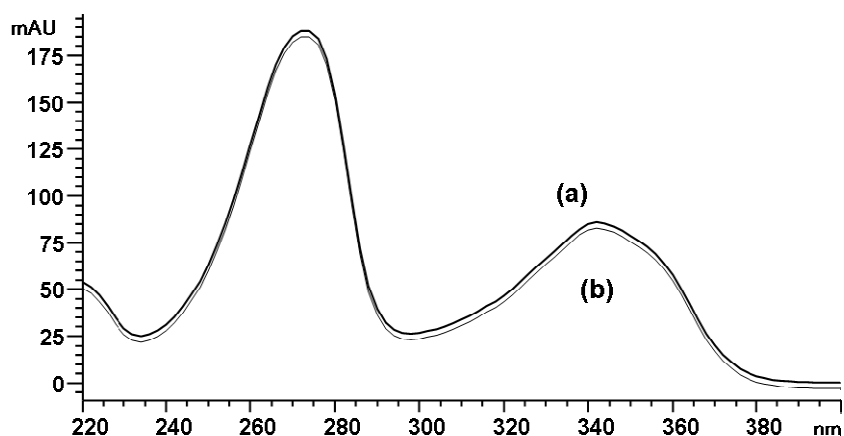


FIGURA 5.7. Espectros sobrepostos de absorção na região do UV (220 a 400 nm) obtidos em detector de arranjo de fotodiodos, acoplado ao sistema de CLAE, das soluções de SQR de MGF (a) e da amostra dos comprimidos de MGF (b).

A semelhança entre os tempos de retenção relativos (5,61 minutos) obtidos para as soluções da SQR de MGF e nos comprimidos revestidos, bem como a similaridade entre os espectros obtidos nesses tempos de retenção, demonstra a adequabilidade do método desenvolvido por CLAE para a determinação qualitativa de MGF nos comprimidos revestidos.

5.3.5. Eletroforese capilar (EC)

5.3.5.1. Condições eletroforéticas

Os experimentos foram conduzidos em equipamento de eletroforese capilar Agilent®, modelo CE (Waldbronn, Alemanha) equipado com autoamostrador, detector de arranjo de fotodiodos, sistema de controle de temperatura e fonte de fornecimento de tensão de até 30 kV. O controle do equipamento, aquisição e análise de dados foi realizado utilizando software CE ChemStation. As condições eletroforéticas definidas para identificação e quantificação de MGF estão apresentadas na Tabela 5.3.

TABELA 5.3. Condições eletroforéticas otimizadas para quantificação de MGF nos comprimidos revestidos por EC

Parâmetro	Descrição
Eletrólito	Solução tampão borato de sódio 25 mM pH 10,0
Pré-condicionamento	NaOH 0,1 M (2 min), água (2 min) e eletrólito (2 min)
Capilar	48 cm (40 cm de tamanho efetivo) com diâmetro de 50 µm
Voltagem	30 kV
Modo e tempo de injeção	Hidrodinâmica por pressão de 6 seg
Deteção	220 nm, detector de arranjo de fotodiodos
Temperatura do capilar	30 °C
Padrão interno	Ácido salicílico

Pesou-se, exatamente a SQR de MGF, equivalente a 10,0 mg de gemifloxacino e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 50 ml com metanol (200,0 µg/ml de gemifloxacino base). Transferiu-se uma alíquota de 5,0 ml dessa solução e 1,0 ml de solução estoque de padrão interno de ácido salicílico (1 mg/ml) para balão volumétrico de 20 ml e completou-se o volume com tampão borato de sódio 25 mM pH 7,5, de modo a obter concentração de 50 µg/ml em gemifloxacino base. O mesmo procedimento foi realizado para a preparação da solução amostra, porém anteriormente à diluição a solução foi filtrada.

5.3.5.2. Resultados e discussão

Os eletroferogramas sobrepostos da SQR de MGF e da solução amostra dos comprimidos de MGF, estão apresentados na Figura 5.8.

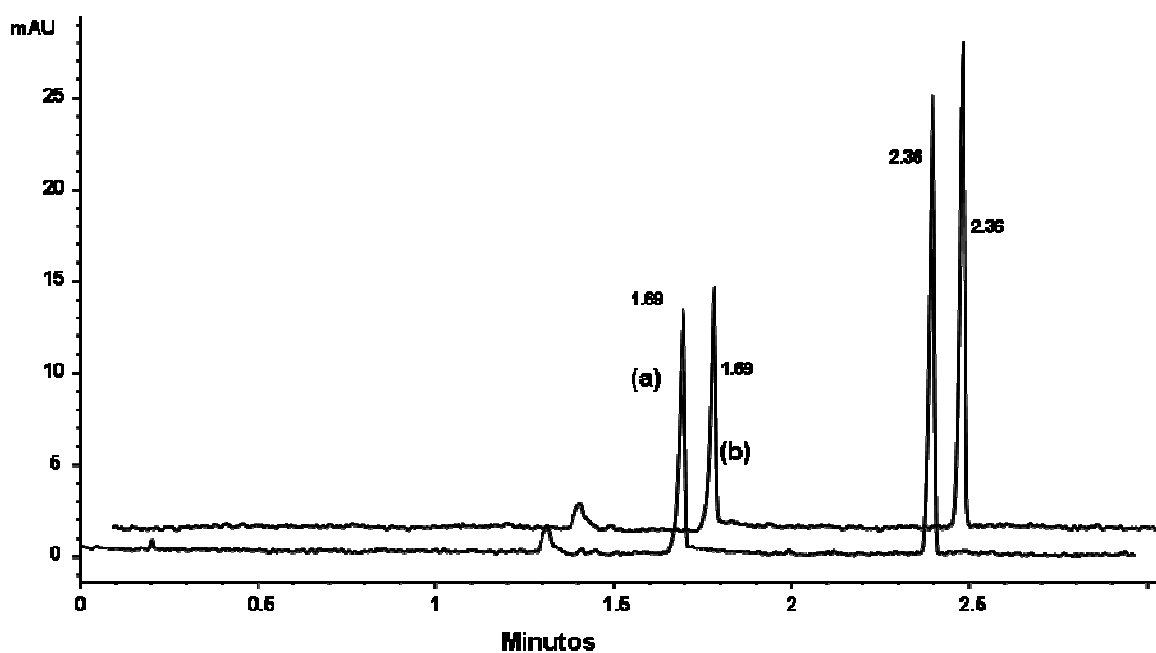


FIGURA 5.8. Eletroferogramas sobrepostos da SQR de MGF (1,69 minutos) (a) e da solução amostra dos comprimidos de MGF (b) a 20 $\mu\text{g/ml}$ em tampão borato de sódio 25 mM pH 7,5. Condições eletroforéticas: eletrólito: solução tampão borato de sódio 25 mM pH 10,0, voltagem de 30 kV, capilar de sílica fundida de 48 cm (40 cm efetivo), detecção em 220 nm, tempo de injeção 6 segundos, temperatura de análise do capilar 30 °C. Padrão interno de ácido salicílico: 2,36 minutos. Eletroferograma (b) propositadamente deslocado.

A semelhança entre os tempos de migração relativos (1,69 minutos) obtidos para as soluções da SQR de MGF e nos comprimidos revestidos, bem como a similaridade entre os espectros obtidos nesses tempos de migração (Figura 5.9), demonstra a adequabilidade do método desenvolvido por EC para a determinação qualitativa de MGF nos comprimidos revestidos.

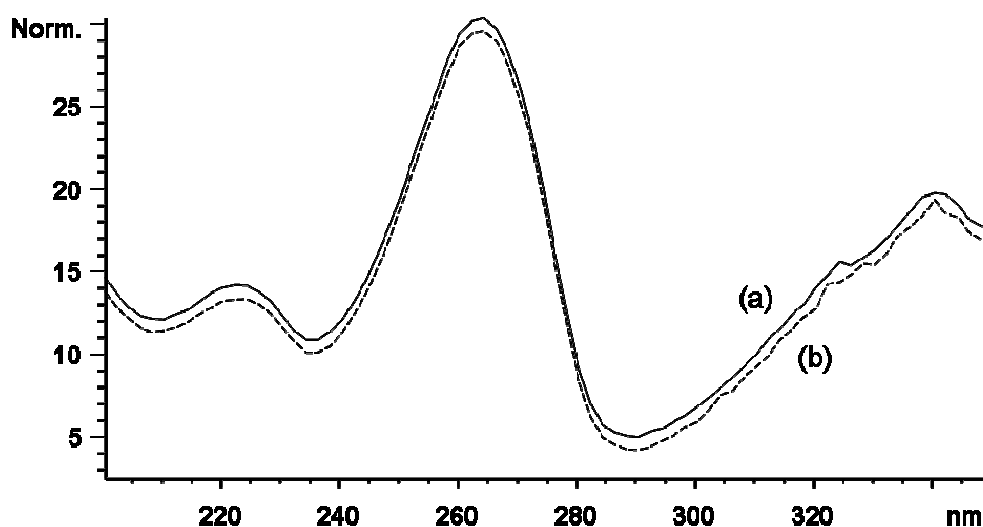


FIGURA 5.9. Espectros sobrepostos de absorção na região do UV (200 a 350 nm) obtidos em detector de arranjo de fotodiodos, acoplado ao sistema de EC, das soluções de SQR de MGF (a) e da amostra dos comprimidos de MGF (b).

5.4. Conclusões

- O método proposto por CCD mostrou-se adequado para identificação de MGF nos comprimidos revestidos, bem como apresentou seletividade para diferenciar produtos estruturalmente semelhantes;
- A obtenção de espectros com os mesmos comprimentos de onda máximos e mínimos de absorção, para as soluções da SQR de MGF e da amostra de MGF nos comprimidos, demonstrou a viabilidade da utilização dos métodos por E UV e VIS para determinação qualitativa do fármaco em sua forma farmacêutica estudada;
- A semelhança entre os tempos de retenção dos picos cromatográficos obtidos para as soluções da SQR e para a amostra de MGF e a similaridade entre os espectros obtidos demonstraram a viabilidade da utilização do método por CLAE para identificação do fármaco nos comprimidos revestidos;
- A semelhança entre os tempos de migração dos picos eletroforéticos obtidos para as soluções da SQR e para a amostra de MGF e a similaridade entre os

espectros obtidos demonstraram a viabilidade da utilização do método por EC para identificação do fármaco nos comprimidos revestidos.

**6. CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE MGF EM
COMPRIMIDOS REVESTIDOS**

6.1. Introdução

A validação de um procedimento analítico nos permite garantir que o mesmo é adequado para o seu uso proposto. Devido a isso, todos os métodos desenvolvidos nesse trabalho foram validados de acordo com os Códigos Oficiais e os seguintes parâmetros de desempenho analítico foram avaliados: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, robustez e, quando necessário, limites de detecção e quantificação (BRASIL, 2003, ICH, 2005a; USP 34, 2011).

As técnicas espectrofotométricas estão fundamentadas na absorção da energia eletromagnética por moléculas e depende da concentração e da estrutura química das mesmas (FB 5, 2010). A E UV/VIS é um método utilizado no controle de qualidade de produtos farmacêuticos, devido ao potencial da grande maioria dos fármacos de absorver energia nessas regiões. Mesmo apresentando seletividade dependente do grupamento cromóforo presente, o método apresenta uma série de aplicações na quantificação de fármacos em produtos farmacêuticos onde não existe a interferência dos excipientes, determinação de pKa, liberação do fármaco em testes de dissolução, monitoramento da cinética de degradação e identificação de fármacos através do comprimento de absorção máxima em determinado solvente. Além disso, o método por E VIS pode ser baseado na ligação do fármaco com compostos que permitem a formação de complexos de coordenação ou complexos coloridos que podem ser quantificados nesta região (WATSON, 2005).

A CLAE tem apresentado grande desenvolvimento principalmente em relação às inovações em colunas e *softwares* de controle dos equipamentos. Por essa razão, é o método de escolha da Indústria Farmacêutica para a realização do controle de qualidade de seus produtos e o método mais preconizado pelos Códigos Oficiais (WATSON, 2005). A maioria das separações de substâncias em análises farmacêuticas é realizada pelo método de partição dos componentes, presentes na solução a ser analisada, entre a fase móvel e a fase estacionária, no qual a afinidade de uma substância pela fase estacionária e, conseqüentemente, seu tempo de retenção na coluna, é controlado pela polaridade da fase móvel (FB 5, 2010).

A utilização do ensaio microbiológico é um dos métodos de escolha para avaliação e determinação da potência de antibióticos, quimioterápicos antibacterianos e antifúngicos. O ensaio compara a dose que inibe o crescimento de um micro-organismo sensível com a dose da preparação padrão que produz inibição similar. O parâmetro medido, inibição de crescimento, é similar às propriedades de utilização do fármaco (HEWITT, 2004; FB 5, 2010). A FB 5 (2010) descreve uma série de soluções diluentes, meios de cultura e micro-organismos que podem ser utilizados para o desenvolvimento e validação do ensaio para controle de qualidade dos produtos farmacêuticos.

A eletroforese capilar (EC) é uma técnica de separação muito utilizada para análise de compostos ionizados. Na técnica de EC de zona livre, o mecanismo de separação está baseado nas diferenças apresentadas pela razão carga / massa das espécies analisadas que migram como bandas a velocidades diferenciadas. Os solutos são separados pela combinação entre a mobilidade eletroforética intrínseca e a magnitude do fluxo eletrosmótico no capilar. Sua aplicação permite a determinação quantitativa de fármacos e substâncias relacionadas em matérias-primas e produtos acabados. Devido à alta eficiência do sistema, moléculas com diferenças mínimas em sua razão massa / carga podem ser discriminadas (ALTRIA *et al.*, 1998; FB 5, 2010).

Para o desenvolvimento do método analítico e a otimização da separação por EC, a avaliação de diferentes parâmetros instrumentais (voltagem aplicada, temperatura, capilar) e relacionados à solução eletrolítica (tipo, concentração e pH do eletrólito) são importantes (ALTRIA *et al.*, 1998; FB 5, 2010).

A determinação quantitativa de MGF em comprimidos revestidos foi realizada utilizando a E UV, E VIS, CLAE, ensaio microbiológico e a EC, apresentados nesse trabalho na forma de artigos científicos.

6.2. Validação do método por E UV

Paper: Gemifloxacin mesylate (GFM): UV spectrophotometric method for quantitative determination using experimental design for robustness evaluation

Artigo publicado no Periódico Química Nova 2012, v.35(1), p.193-197

A validação do método por E UV para determinação quantitativa de MGF nos comprimidos revestidos foi realizada utilizando metanol como diluente nos dois comprimentos de onda máximos do fármaco nas condições do estudo (272 nm e 343 nm). O método demonstrou especificidade em ambos os comprimentos de onda, pois os excipientes da formulação não interferiram na quantificação do fármaco. A linearidade foi avaliada na faixa de 2 a 15 µg/ml em 272 nm e de 6 a 25 µg/ml em 343 nm. Os valores de coeficiente de correlação obtidos foram de 0,99993 e 0,99991 em 272 nm e em 343 nm, respectivamente. A análise da variância (ANOVA) demonstrou que existe regressão linear e não existe desvio de linearidade para os dados obtidos em ambas as condições, demonstrando a linearidade do método analítico para $\alpha = 0,05$.

A precisão, avaliada por meio da precisão intermediária e da repetibilidade, demonstrou valores inferiores a 2,0% de desvio padrão relativo (DPR) em ambas as condições. A exatidão do método analítico foi demonstrada com valores de recuperação nas faixas de 98,64% a 100,68% em 272 nm e de 99,10% a 101,32% em 343 nm.

A robustez do método por E UV foi avaliada utilizando um desenho experimental de Plackett-Burmann, no qual foram realizadas pequenas alterações no tempo de sonicação e no comprimento de onda máximo e modificação na marca do solvente utilizado para extração. Os resultados demonstraram que essas modificações nos fatores em estudo não interferiram na determinação quantitativa do fármaco por E UV, demonstrando a robustez do método analítico.

Os resultados obtidos indicaram que o método analítico por E UV apresentou especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, demonstrando-se adequado para determinação quantitativa do fármaco em 272 nm e 343 nm.

A validação do método por E UV está publicado *online* no Periódico Química Nova 2012, v.35(1), p.193-197 com o título de "**Gemifloxacin mesylate (GFM): UV spectrophotometric method for quantitative determination using experimental design for robustness evaluation**".

6.3. Validação do método por E Vis

Paper: High selective colorimetric method to determine gemifloxacin mesylate in the presence of the synthetic impurity 1-cyclopropyl-6-fluoro-7-chloro-4-oxo-1,4-dihydro-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid.

Aceito para publicação no Periódico Journal of AOAC International

A validação do método por E VIS foi baseada na capacidade da amina primária, presente na molécula de MGF, em formar complexos de par-iônico com derivados sulfoftaleínas, como, por exemplo, o verde de bromocresol, em meio tamponado ácido (pH entre 3 e 4). O complexo de par-iônico formado foi extraído com clorofórmio.

As condições ótimas de análise foram definidas utilizando um desenho experimental de composto central (Minitab[®]) para verificação das melhores condições de formação do complexo de par-iônico. A definição dessas condições foi realizada por meio da variação da concentração e do pH da solução tampão de biftalato de potássio, utilizada para promover a formação do complexo de par-iônico entre o fármaco e o derivado sulfoftaleína.

O método demonstrou especificidade para a determinação do fármaco na presença dos excipientes da formulação e da principal impureza de síntese do fármaco (ácido 1-ciclopropil-6-flúor-7-cloro-4-oxo-1,4-diidro-1,8-naftiridina-3-carboxílico). A linearidade foi demonstrada na faixa de 12 µg/ml a 28 µg/ml e apresentou um coeficiente de correlação de 0,9984. A análise estatística realizada pela ANOVA demonstrou que os dados obtidos apresentaram regressão linear significativa e desvio de linearidade não-significativa ($\alpha = 0,05$).

Os resultados demonstraram a precisão intermediária e a repetibilidade do método analítico com valores de DPR inferiores a 2,0% nas análises de determinação quantitativa. Faixas de recuperação de 102,21% a 103,04%, demonstraram a exatidão do método analítico. A robustez, avaliada por meio de pequenas alterações no tempo de extração do complexo formado, volume de solução tampão de biftalato de potássio e do volume de solução de verde de bromocresol, foi realizada utilizando um desenho experimental de Plackett-Burmann. Os resultados obtidos durante a validação demonstraram a adequabilidade do método desenvolvido para determinação do fármaco MGF nos comprimidos revestidos.

O trabalho de validação do método por E VIS para determinação quantitativa do MGF em comprimidos revestidos está aceito para publicação no Periódico Journal of AOAC International. O trabalho será publicado com o seguinte título: **High**

selective colorimetric method to determine gemifloxacin mesylate (GFM) in the presence of the synthetic impurity 1-cyclopropyl-6-fluoro-7-chloro-4-oxo-1,4-dihydro-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid.

6.4. Validação do método por CLAE

Paper: Stability-indicating LC assay and determination of system suitability limits with a robustness test of gemifloxacin mesylate in tablets

Publicado no Periódico Current Analytical Chemistry, v. 6, p. 269, 2010

O desenvolvimento do método por CLAE foi realizado objetivando a separação entre uma impureza de síntese presente na SQR de MGF e o fármaco. A partir de estudos preliminares as condições cromatográficas foram definidas utilizando como fase móvel uma mistura de trietilamina 0,3% (pH 3, ajustado com ácido fosfórico 10%) e acetonitrila (70:30), vazão de 1 ml/min, coluna Eclipse® C18, detecção em 272 nm e volume injetado de 20 µl. Estudos de degradação forçada, realizados para validação do método analítico indicativo de estabilidade, demonstraram a instabilidade do fármaco na SQR e nos comprimidos revestidos à hidrólise básica (NaOH 0,01M), ácida (HCl 0,1M), fotólise (radiação UVA e UVC) e ao calor seco. No entanto, os produtos de degradação forçada não interferiram na quantificação do fármaco, verificado pelas ferramentas do *software* de pureza do pico de MGF.

A linearidade do método foi comprovada na faixa de 5 a 40 µg/ml por meio da ANOVA, onde se verificou que não ocorreu desvio de linearidade. A regressão linear dos dados foi significativa para $\alpha = 0,05$, com um coeficiente de correlação de 0,9998. A precisão, demonstrada por meio da precisão intermediária e da repetibilidade, apresentou valores de DPR inferiores a 2,0%. Faixas de recuperação de 100,78% a 102,19% demonstraram a exatidão do método analítico por CLAE.

Um desenho experimental de Plackett-Burmann foi realizado para verificação da robustez do método analítico e para a definição dos limites de adequabilidade do sistema nas condições validadas. Modificações no pH da fase móvel, porcentagem de acetonitrila, temperatura da coluna, vazão, comprimento de onda de detecção e marca da coluna, não influenciaram na determinação quantitativa do fármaco, demonstrando a robustez do método analítico. A partir dos resultados obtidos durante o desenho experimental também foram definidos os limites de adequabilidade do sistema: resolução de 4,67 entre o fármaco MGF e a impureza de síntese presente na SQR, assimetria: 1,42, número de pratos teóricos: 7190 e fator de retenção: 1,92 para o pico de MGF.

Os resultados obtidos durante a validação demonstraram a adequabilidade do método desenvolvido por CLAE para quantificar o MGF nos comprimidos revestidos, mesmo na presença de potenciais produtos de degradação formados. Nesta parte do trabalho também foi realizada a determinação da cinética de fotodegradação de

uma solução metanólica de MGF exposta à radiação UV A. Nas condições de estudo o fármaco apresentou uma degradação de primeira ordem de reação, com valores de constante específica de reação (k) de $0,0352 \text{ min}^{-1}$ e um valor de t_{90} de 3,01 min.

A validação do método por CLAE está publicado no Periódico Current Analytical Chemistry, v.6, p.269, 2010 com o título de **“Stability-indicating LC assay and determination of system suitability limits with a robustness test of gemifloxacin mesylate in tablets”**.

6.5. Validação do Ensaio Microbiológico

Paper: Gemifloxacin mesylate (GFM) stability evaluation applying a validated bioassay method and *in vitro* cytotoxic study

Publicado no Periódico Talanta, v. 83, p. 1774, 2011

O desenvolvimento do ensaio microbiológico para a determinação da potência do MGF em comprimidos revestidos foi realizado por meio da otimização de métodos previamente descritos para análogos quinolônicos. O objetivo era a obtenção de halos de inibição bem definidos e de tamanho adequado para determinação da potência do fármaco MGF, de forma precisa e exata. A partir de estudos preliminares as seguintes condições foram definidas: micro-organismo *Staphylococcus epidermidis* 2% como suspensão de inóculo, meio de cultura número 1, metanol e solução tampão fosfato pH 6,0 1% (FB 5, 2010) como diluentes das soluções e concentrações de trabalho na faixa de 5 a 4,5 µg/ml para as soluções padrão e amostra.

Estudos de degradação forçada, realizados nas mesmas condições definidas para o método por CLAE indicativo de estabilidade, demonstraram equivalência nos resultados de degradação do fármaco, demonstrando que os produtos de degradação obtidos não interferem na determinação de potência do fármaco. Durante a especificidade também foi demonstrado que a principal impureza de síntese e os excipientes da formulação não possuem atividade significativa nas condições do estudo, ou seja, não ocorreu a formação de halos de inibição.

O método apresentou linearidade na faixa estudada (5 a 4,5 µg/ml), bem como, precisão e exatidão para determinação do fármaco nos comprimidos revestidos. Modificações no pH da solução tampão diluente e na concentração da suspensão do inóculo demonstraram a robustez do método analítico.

Os resultados obtidos durante a validação demonstraram a adequabilidade do ensaio microbiológico para determinação da potência do MGF nos comprimidos revestidos, bem como, a intercambialidade do ensaio microbiológico com o método físico-químico, previamente desenvolvido por CLAE.

A validação do ensaio microbiológico está publicado no Periódico Talanta (v.83, p.1774, 2011, doi:10.1016/j.talanta.2010.11.069) com o título de **“Gemifloxacin mesylate (GFM) stability evaluation applying a validated bioassay method and *in vitro* cytotoxic study”**.

6.5. Validação do método por EC

Paper: Simultaneous analysis of gemifloxacin mesylate and its main synthetic impurity by an optimized capillary zone electrophoretic method.

Artigo submetido à publicação

O desenvolvimento do método por EC foi realizado objetivando a separação e quantificação do fármaco MGF e de sua principal impureza de síntese (ácido 1-ciclopropil-6-flúor-7-cloro-4-oxo-1,4-diidro-1,8-naftiridina-3-carboxílico). Durante o desenvolvimento do método analítico uma série de condições experimentais foram avaliadas, com modificações no sal, pH e concentração da solução tampão do eletrólito, temperatura do capilar, corrente aplicada e tempo e modo de injeção. As condições eletroforéticas otimizadas foram: solução tampão de borato de sódio 25 mM pH 10 como eletrólito, corrente de 30 kV, capilar de 50 µm de diâmetro interno e 48 cm (40 cm efetivo), tempo de injeção hidrodinâmica por pressão de 6 seg e comprimento de onda de detecção de 220 nm. Nessas condições obtiveram-se valores de adequabilidade do sistema satisfatórios para as substâncias analisadas (MGF, impureza de síntese e o padrão interno de ácido salicílico utilizado como padrão interno) e um tempo de análise extremamente curto (2,5 minutos).

Estudos de degradação forçada demonstraram a suscetibilidade do MGF à hidrólise básica e ácida, a fotólise e ao calor seco. No entanto, os produtos de degradação formados não interferiram na quantificação do MGF, demonstrando a seletividade do método. Estudos comprovaram a linearidade na faixa de 20,0 a 80,0 µg/ml para o fármaco MGF e de 3,0 a 20 µg/ml para a impureza de síntese. Os valores de coeficientes de correlação foram de 0,9961 e de 0,9979 para o MGF e para a impureza de síntese, respectivamente. A análise da variância (ANOVA) demonstrou que existe regressão linear e não existe desvio de linearidade para os dados obtidos para ambas as substâncias.

A precisão foi avaliada por meio da repetibilidade e da precisão intermediária. Os resultados apresentaram valores de DPR inferiores a 2,0% para a quantificação do MGF nos comprimidos revestidos e inferiores a 5,0% para a impureza de síntese, os quais, de acordo com a literatura, estão adequados (ERMER *et al.*, 2005).

A exatidão foi avaliada por meio do teste de recuperação. A faixa de recuperação do MGF variou de 98,10% a 99,34% demonstrando a exatidão do método para quantificação do MGF nos comprimidos revestidos. A faixa de recuperação da impureza de síntese variou de 94,20% a 102,64%, demonstrando-se adequada para a quantificação de impurezas em produtos farmacêuticos (ERMER *et al.*, 2005).

A avaliação da robustez para a determinação do MGF e da impureza de síntese foi verificada com a utilização de um desenho experimental de Plackett-Burmann. Os resultados obtidos demonstraram que pequenas modificações nos fatores avaliados (pH do eletrólito, concentração molar do eletrólito, voltagem aplicada, temperatura do capilar, comprimento de onda de detecção e tempo de injeção) não interferiram significativamente na quantificação do fármaco e de sua principal impureza de síntese.

A validação do método por EC para determinação quantitativa do MGF e de sua principal impureza de síntese (ácido 1-ciclopropil-6-flúor-7-cloro-4-oxo-1,4-diidro-1,8-naftiridina-3-carboxílico) em comprimidos revestidos está submetido à publicação com o título de **“Simultaneous analysis of gemifloxacin mesylate and its main synthetic impurity by an optimized capillary zone electrophoretic method”**.

7. CAPÍTULO IV - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO TESTE DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS DE MGF

Paper: Gemifloxacin mesylate (GMF): dissolution test based on *in vivo* data

Artigo submetido à publicação

7.1. Introdução

A absorção de fármacos após administração oral, a partir de formas farmacêuticas sólidas, depende de sua liberação da forma farmacêutica, da dissolução ou solubilização sob condições fisiológicas e da permeabilidade através das membranas. Fatores relacionados ao paciente, tais como fisiologia da membrana, fluxo sanguíneo e pH do trato gastrintestinal, bem como fatores relacionados ao fármaco e à formulação, como solubilidade e natureza química do fármaco, polimorfismo, coeficiente de partição, quiralidade, tamanho de partícula, entre outros, tornam o processo de absorção complexo e variável. Qualquer fator que afete a desagregação ou a dissolução pode afetar a biodisponibilidade do fármaco (SHARGEL *et al.*, 2005).

A classificação biofarmacêutica do fármaco pode ser utilizada no desenvolvimento do método de dissolução e verificação da possibilidade de realização da correlação *in vivo-in vitro* (CIVIV). De acordo com AMIDON e colaboradores (1995), os fármacos podem ser classificados em quatro classes biofarmacêuticas:

- Classe 1: alta solubilidade e alta permeabilidade;
- Classe 2: baixa solubilidade e alta permeabilidade;
- Classe 3: alta solubilidade e baixa permeabilidade;
- Classe 4: baixa solubilidade e baixa permeabilidade;

A CIVIV é esperada quando a dissolução é a etapa limitante da absorção do fármaco na circulação, ou seja, para aqueles com baixa solubilidade. Por essa razão, se o fármaco é altamente permeável e a dissolução é a etapa limitante da absorção (Classe 2), é muito provável o desenvolvimento de uma CIVIV (AMIDON *et al.*, 1995; FDA, 2000).

Além da possibilidade da CIVIV, o teste de dissolução é requisito fundamental na indústria farmacêutica para assegurar a qualidade lote a lote do produto farmacêutico, desenvolvimento de novas formulações e garantir a qualidade após mudanças na formulação e no processo de produção, avaliar a qualidade da

formulação em função do tempo e condições de armazenamento durante o período de validade do produto (FDA, 1997; MARQUES e BROWN, 2002). Devido a isso, o teste de dissolução é exigido pelo FDA para todos os produtos apresentados como formas farmacêuticas sólidas de uso oral (SHARGEL *et al.*, 2005).

O percentual de dissolução pode ser influenciado por diversos fatores, dentre os quais o processo de fabricação da forma farmacêutica, os tipos e quantidades de excipientes utilizados, o teor de água e as propriedades físico-químicas do fármaco (SKOUG *et al.*, 1997). A seleção criteriosa das condições de ensaio deve ser orientada no sentido de obter o máximo poder discriminativo, resultar na capacidade de detecção de eventuais desvios dos padrões de qualidade inicialmente propostos e distinguir mudanças significativas na composição ou no processo de produção (MANADAS *et al.*, 2002; USP 34, 2011).

Os meios de escolha mais usuais para o desenvolvimento do teste de dissolução são ácido clorídrico diluído, soluções tampões na faixa de pH fisiológico, água e tensoativos (polissorbato 80, sais biliares e laurilsulfato de sódio). A escolha do meio ideal para ensaios de rotina deve estar relacionada com a capacidade discriminativa, estabilidade do fármaco no meio e relevância do desempenho *in vivo-in vitro*, quando possível (USP 34, 2011). Além disso, o conhecimento das propriedades físico-químicas do fármaco, como pKa, solubilidade, função da relação pH/tensoativo e estabilidade em função do pH são de suma importância (SKOUG *et al.*, 1997).

Conforme anteriormente relatado, a literatura pesquisada não apresenta a descrição completa da validação do teste de dissolução e estudos de CIVIV para comprimidos de MGF. Diante disso, justifica-se o desenvolvimento e validação de um teste de dissolução a partir de dados de absorção *in vivo* obtidos da literatura para comprimidos do fármaco.

A validação de métodos analíticos para dissolução de formas farmacêuticas sólidas deve incluir a avaliação da especificidade, estabilidade do fármaco no meio de dissolução, precisão, exatidão, linearidade e robustez.

O principal objetivo do trabalho foi o desenvolvimento de um teste de dissolução baseado em dados *in vivo* obtidos da literatura. A partir desses dados,

realizou-se, com auxílio do programa *Scientist v.2.* (MicroMath, USA), utilizando modelo de dois compartimentos abertos via oral, a modelagem dos dados e a determinação dos valores das microconstantes de distribuição (k_{12} e k_{21}) e da constante de eliminação (k_{el}). A partir desses valores foi determinada a fração absorvida (FA) do fármaco nas condições do estudo utilizando o método de Loo-Riegelman.

Estudos de solubilidade demonstraram que a SQR de MGF apresentou condição *sink* em HCl 0,01 M e tampão fosfato de potássio 50 mM pH 4,0, No entanto, em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,0, o fármaco apresentou a solubilidade total da dose (320 mg) em 900 ml de meio de dissolução. Em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,8, a solubilidade do fármaco demonstrou-se muito baixa e não ocorreu a solubilização total da dose.

Os resultados de ensaios preliminares de dissolução utilizando 900 ml de meios de dissolução utilizando HCl 0,01 M, tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,0 e tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,8, equipamento com pás e rotação de 50 rpm demonstraram similaridade entre a fração absorvida do fármaco e o perfil de dissolução utilizando tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,0. Diante disso, 2 perfis de dissolução com 12 comprimidos foram realizados e os valores de fração dissolvida *versus* fração absorvida foram plotados. O valor do coeficiente de correlação entre a FA do fármaco, obtida a partir de dados *in vivo* da literatura e a fração dissolvida (FD) utilizando tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,0 como meio de dissolução e equipamento com pás e rotação de 50 rpm foi de 0,9926, demonstrando um ótimo coeficiente de correlação entre os dados. O valor do coeficiente de correlação entre a FA do fármaco, obtida a partir de dados *in vivo* da literatura e a fração dissolvida (FD) utilizando HCl 0,01 M como meio de dissolução e equipamento com pás e rotação de 50 rpm foi de 0,7767. Nessas condições concluiu-se a condição utilizando tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,0 simula melhor o comportamento do fármaco MGF *in vivo*.

O teste de dissolução foi validado utilizando os seguintes parâmetros analíticos: especificidade, precisão, exatidão, linearidade e robustez. A estabilidade do fármaco no meio de dissolução e na fase móvel, bem como, a interferência do filtro utilizado também foi avaliada.

O trabalho descrevendo o desenvolvimento de um teste de dissolução de comprimidos revestidos de MGF simulando o comportamento *in vivo* está submetido à publicação com o título de “**Gemifloxacin mesylate (GFM): dissolution test based on *in vivo* data**”.

8. CAPÍTULO V - ESTUDO DE ESTABILIDADE: ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO

Paper: Structural elucidation of gemifloxacin mesylate degradation product

Artigo submetido à publicação

8.1 Introdução

A estabilidade é definida pela Farmacopeia Americana (USP 34, 2011), como a capacidade que um produto possui em manter as mesmas propriedades e características que possuía no período de sua produção, dentro de limites especificados e do período de validade. A estabilidade pode ser dividida em cinco tipos:

Química: integridade química do fármaco e da potência declarada dentro dos limites especificados.

Física: características físicas originais de aparência, palatabilidade, uniformidade e dissolução.

Microbiológica: esterilidade ou resistência ao crescimento bacteriano.

Terapêutica: manutenção do efeito terapêutico.

Toxicológica: sem aumento significativo da toxicidade.

A determinação da estabilidade fornece informações sobre como a qualidade da matéria-prima ou mesmo do produto acabado pode ser influenciada por uma série de fatores físicos e químicos, tais como, temperatura, umidade, luz, gases atmosféricos, solventes, pH, interações, contaminação microbiológica, entre outros (KOMMANABOYINA e RHODES, 1999; MATTHEWS, 1999). Além disso, fatores como incompatibilidades, oxidações, reduções, hidrólise e racemizações também podem ocasionar a degradação desses produtos (NUDELMAN, 1975).

De acordo com o ICH (2003), os testes de estabilidade devem ser conduzidos em duas etapas: testes acelerados e testes confirmatórios. Os testes acelerados de estabilidade (degradação forçada) servem para identificar os fatores que provocam a degradação do fármaco, selecionar os critérios de condução dos testes e para avaliar a adequabilidade das técnicas analíticas. Os estudos confirmatórios devem ser realizados para propiciar informações necessárias sobre a manipulação, embalagem e rotulagem dos produtos e para verificar se as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas do produto se mantêm durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado (BRASIL, 2005).

O estudo de estabilidade do MGF foi realizado por meio da degradação forçada do fármaco para o desenvolvimento dos métodos analíticos indicativos de estabilidade (Capítulo III) e do isolamento e elucidação estrutural do produto de degradação majoritário, obtido nos estudos de degradação forçada, descrito no artigo a seguir apresentado.

A partir dos resultados de degradação forçada realizados para validação do método analítico por CLAE, condições mais drásticas em meio ácido (HCl 1 M), radiação UV A (60 minutos) e meio alcalino (NaOH 0,2 M) foram utilizadas para verificação do produto de degradação majoritária do MGF em comprimidos revestidos.

Os estudos demonstraram que o produto obtido em condições alcalina após neutralização com ácido (HCl 0,2 M) foi considerado como o produto de degradação majoritário. Diante disso, as condições cromatográficas desenvolvidas e validadas para o método indicativo de estabilidade por CLAE, foram otimizadas, com a utilização de uma coluna semipreparativa, o que propiciou um volume de 90 µl de solução degradada e fase móvel foi constituída de água e acetonitrila (70:30) para o isolamento do produto de degradação majoritário.

Ensaio utilizando o método analítico indicativo de estabilidade por CLAE foram realizados para verificação da pureza das frações coletadas utilizando o método em condições semipreparativas.

Após o isolamento de quantidade suficiente para a elucidação estrutural (30 mg), análises por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN ¹H e RMN ¹³C) e de correlação (COSY, HSQC e HMQC), espectrofotometria no infravermelho (E IV), espectrofotometria no ultravioleta (E UV), espectrometria de massas (EM) e emissão atômica por fotometria de chama foram realizados.

Os resultados demonstraram que o provável produto de degradação isolado é o sal sódico do ácido 7-amino-1-ciclopropil-6-fluor-1,4-diidro-4-oxo-1,8-naftiridina-3-carboxílico.

O trabalho descrevendo o isolamento e a elucidação estrutural do produto de degradação majoritário de MGF está submetido à publicação com o título de **“Structural elucidation of gemifloxacin mesylate degradation product”**.

9. CAPÍTULO VI – ESTUDOS DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Paper: Biological safety studies of Gemifloxacin mesylate and related substances

Artigo submetido à publicação

9.1 Introdução

De acordo com os Guias do ICH Q3A(R2) e Q3B(R2) é de suma importância a elucidação estrutural e a determinação da segurança biológica de impurezas e produtos de degradação em fármacos e produtos acabados, presentes em quantidades superiores ao especificado.

Diante disso, as Agências Regulatórias tem enfatizado a necessidade da avaliação dos riscos que apresentam as substâncias químicas sobre a saúde pública e o meio ambiente, para os quais preconiza geralmente o ensaio com animais. No entanto, a literatura apresenta uma série de ensaios *in vitro* com o objetivo de substituir ou reduzir o número de animais nos teste de toxicidade. Neste contexto, os ensaios de citotoxicidade se encontram entre os métodos *in vitro* utilizados com maior frequência para prever a toxicidade de uma substância (MARTINEZ-HIDALGO, 2007).

O teste de citotoxicidade em linhagens celulares tem sido proposto como uma alternativa para o ensaio de toxicidade aguda. O teste permite a utilização de diferentes linhagens celulares de hepatomas HepG2 ou queratinócitos. A utilização de fibroblastos de ratos (3T3) também tem sido proposta para definição da dose inicial para os ensaios de toxicidade aguda, o qual ainda deve ser realizado em animais (MARTINEZ-HIDALGO, 2007).

No entanto, a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) desde 2004 preconiza a utilização de um teste validado *in vitro* para a determinação do potencial fototóxico de determinadas classes de substâncias. O teste da OECD 432 (2004) utiliza linhagem de células de fibroblastos de rato (3T3) e mecanismo de recaptção do vermelho neutro (NRU) para determinação da redução da viabilidade das células expostas às substâncias químicas. A avaliação do potencial fototóxico (PIF) de uma substância é realizada por meio da relação entre a concentração da substância que reduz a viabilidade celular em 50% em relação a um controle não-tratado, na presença e na ausência de radiação UV-A. Uma substância é considerada fototóxica se o valor de PIF for superior a 5. O teste validado pela OECD se adapta ao princípio de substituição da política dos 3 R

(redução, substituição e refinamento), evitando a utilização de animais nos ensaios e a utilização de um modelo experimental alternativo *in vitro*.

Os testes de genotoxicidade são definidos como testes *in vivo* e *in vitro* utilizados para detectar componentes que possam induzir diretamente ou indiretamente danos genéticos por vários mecanismos. Devido a essa complexidade, não existe um ensaio único que possa ser utilizado, mas uma bateria de testes. A literatura preconiza ensaios em linhagens de bactérias para verificação do potencial mutagênico e testes *in vitro* e *in vivo* para avaliação do dano cromossômico em células de mamíferos e em células hematopoiéticas de roedores, respectivamente (ICH S2B, 1998).

A determinação do potencial citotóxico e fototóxico do fármaco MGF e de suas substâncias relacionadas foi realizada de acordo com o Guia da OECD 432 (2004) e o potencial genotóxico foi realizado utilizando o ensaio cometa. Objetivou-se a realização desses ensaios devido ao potencial fototóxico e genotóxico atribuído a alguns integrantes da classe das fluorquinolonas.

Os resultados de citotoxicidade utilizando o método de recaptção do vermelho neutro (NRU) e de redução do sal de tetrazóico (MTT) demonstraram o maior potencial citotóxico e fototóxico da principal impureza de síntese (ácido 1-ciclopropil-6-flúor-7-cloro-4-oxo-1,4-diidro-1,8-naftiridina-3-carboxílico) e do produto de degradação isolado e elucidado (sal sódico do ácido 7-amino-1-ciclopropil-6-fluor-1,4-diidro-4-oxo-1,8-naftiridina-3-carboxílico) de MGF em comparação com o próprio fármaco.

A determinação do potencial de fotoirritação (PIF) utilizado para determinação do potencial fototóxico de uma substância, apresentou valores superiores a 5 para a impureza de síntese e para o produto de degradação, o que demonstra o potencial fototóxico das mesmas. O valor encontrado para o MGF na faixa de 2 a 5 demonstra que o fármaco é uma substância com provável potencial fototóxico (OECD 432, 2004).

Estudos de genotoxicidade e fotogenotoxicidade demonstraram o maior potencial genotóxico do MGF em comparação com suas substâncias relacionadas nas condições de estudo.

Os estudos de segurança biológica do fármaco MGF de suas substâncias relacionadas, incluindo estudos de citotoxicidade, fototoxicidade, genotoxicidade e fotogenotoxicidade estão submetidos à publicação com o título de “**Biological safety studies of Gemifloxacin mesylate and related substances**”.

10. DISCUSSÃO GERAL

O fármaco mesilato de gemifloxacino (MGF), fluoroquinolona de quarta geração, utilizado para o tratamento da pneumonia adquirida da comunidade e da exacerbação aguda da bronquite crônica, embora de importância clínica na terapia medicamentosa, não apresenta monografia nos Códigos Oficiais, o que demonstra a importância do desenvolvimento dos métodos analíticos qualitativos e quantitativos, teste de dissolução, estudo de estabilidade e dos ensaios de segurança biológica do fármaco, de modo a garantir a administração do medicamento de uma maneira segura e eficaz.

Os primeiros estudos realizados foram de caracterização da SQR de MGF empregando a análise térmica por calorimetria exploratória de varredura (DSC), faixa de fusão, espectroscopia na região do IV (E IV) e a ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C).

A utilização da análise térmica por DSC para determinação da pureza de um produto farmacêutico é realizada assumindo que qualquer impureza presente diminuirá e alargará a faixa de fusão característica do produto puro. Isto significa que o perfil do pico de uma substância pura apresenta-se extremamente afilado em um espectro de DSC. No entanto, se existirem impurezas, nota-se a diminuição na temperatura da faixa de fusão e o pico torna-se mais alargado ou, ainda, ocorre o aparecimento de outros picos (FORD e TINMINS, 1989). Entretanto, o método não é indicado para produtos que decompõem durante a fusão, conforme verificado para o MGF. Resultados insatisfatórios também foram obtidos utilizando o método de capilar devido à decomposição do fármaco durante a fusão. A determinação pode ser realizada utilizando o método tipo Kofler, no qual a SQR de MGF apresentou faixa de fusão de 200,8 °C a 204,1 °C, semelhante àquela especificada no Certificado de Análise (201,2 °C a 205,4 °C; LG Life Sciences, 2008). A mudança de estado físico verificada pelo método tipo Kofler pode ser utilizada para caracterização e identificação do fármaco MGF.

A E IV determina informações estruturais sobre a molécula em estudo. As absorções das ligações presentes na molécula são determinadas em faixas do espectro na região do IV, por meio da análise de bandas características dos grupos funcionais presentes. O espectro de absorção no IV pode ser utilizado como a impressão digital da molécula, ou seja, comparando o espectro de absorção no IV

de duas substâncias, pode-se estabelecer se as mesmas são idênticas. Se o espectro IV coincidir banda a banda, pode-se concluir, na maioria dos casos, que as substâncias apresentam a mesma identidade (PAVIA *et al.*, 2001). A interpretação das bandas do espectro de absorção no IV da SQR de MGF permitiu a obtenção de informações estruturais dos grupos funcionais, os quais confirmaram a identidade da molécula.

A caracterização da SQR de MGF também foi realizada por meio da RMN de ^1H e de ^{13}C . A RMN é uma técnica extremamente eficaz para caracterizar exatamente uma estrutura química em matérias-primas (WATSON, 2005). Os resultados obtidos nos ensaios para a SQR de MGF demonstraram que os sinais obtidos estão de acordo com as atribuições esperadas para a molécula de MGF.

Além disso, as informações obtidas nas técnicas de E IV e da RMN de ^1H e ^{13}C foram importantes para a elucidação da estrutura química do produto de degradação isolado.

A utilização dos métodos por E IV, RMN de ^1H e ^{13}C e faixa de fusão permitiram caracterizar a SQR de MGF, ensaios necessários para utilização segura como padrão nos estudos realizados. Além disso, possibilita a publicação desses dados, os quais não constam na literatura pesquisada, gerando informações úteis para o desenvolvimento de novos trabalhos científicos com o fármaco.

A determinação da solubilidade da SQR de MGF pelo método de partes da Farmacopeia Brasileira (FB 5, 2010) gerou informações para conhecimento dos solventes que poderiam ser utilizados no desenvolvimento dos métodos analíticos qualitativos e quantitativos. A água foi o solvente que apresentou a maior solubilidade da SQR de MGF, porém devido às diferenças encontradas de pH entre as soluções padrão e amostra, não foi possível sua utilização como solvente. Alternativamente, foram testadas soluções aquosas tamponadas, todavia a solubilidade do fármaco mostrou-se inferior.

Para o desenvolvimento do método de identificação por CCD foram testadas diversas combinações de solventes orgânicos e água em diferentes proporções, a fim de verificar qual sistema eluente permitiria a obtenção de Rf e Rx adequados para a separação de MGF e cloridrato de ciprofloxacino. O sistema eluente que

proporcionou a melhor separação dos fármacos, com fatores de retenção satisfatórios foi constituído de uma mistura de butanol, água, hidróxido de amônio e acetona (10:15:15:60, v/v). A utilização do método por CCD permitiu identificar o fármaco MGF nos comprimidos revestidos por meio da comparação dos valores dos fatores de retenção (R_f) obtidos com a SQR de MGF (Figura 5.2). Além disso, os resultados demonstraram a capacidade do método desenvolvido em separar substâncias com estruturas químicas semelhantes (MGF e cloridrato de ciprofloxacino), ou seja, apresenta seletividade adequada para diferenciá-las, conforme verificado pelo valor de R_x obtido (1,14). Os valores de R_f obtidos de 0,57 e 0,65 para cloridrato de ciprofloxacino e MGF, respectivamente, mostraram-se adequados para as análises qualitativas.

Os espectros na região do UV, na faixa de 200 a 400 nm, obtidos para as soluções da SQR de MGF e da amostra dos comprimidos de MGF em metanol (Figura 5.4) apresentaram máximos e mínimos de absorção nos mesmos comprimentos de onda. Nessas condições, os comprimentos de onda de absorção selecionados para determinação quantitativa foram de 272 nm e 343 nm.

A semelhança e o mesmo comprimento de onda máximo de absorção (417 nm), obtidos entre o complexo formado do fármaco MGF com o reagente verde de bromocresol, em tampão biftalato pH 3,3, nos espectros das soluções da SQR e dos comprimidos permitiu a utilização do método por E VIS para analisar qualitativamente o fármaco no produto acabado (Figura 5.5). Posteriormente, essas condições foram utilizadas para validação do método para determinação quantitativa do fármaco MGF nos comprimidos revestidos.

A semelhança entre os tempos de retenção relativos obtidos ($t_r = 5,6$ minutos) no método por CLAE para a SQR de MGF e para solução amostra dos comprimidos de MGF (Figura 5.6), bem como a similaridade entre os respectivos espectros, (Figura 5.7) permitiram identificar o fármaco MGF na forma farmacêutica.

A identificação também pode ser realizada utilizando o método por EC. A semelhança entre os tempos de migração obtidos (1,69 minutos) e os espectros para a SQR de MGF e para a solução amostra dos comprimidos de MGF demonstra a identificação positiva do fármaco nos comprimidos revestidos (Figuras 5.8 e 5.9).

A literatura pesquisada apresenta poucos artigos publicados descrevendo métodos quantitativos para controle de qualidade do fármaco e dos comprimidos revestidos. A quantificação por E VIS é descrita em dois artigos de KRISHNA e SANKAR (2008a; 2008b), no qual o fármaco é complexado por meio de métodos de transferência de carga e de par iônico. Em relação à quantificação utilizando a CLAE é descrito um método publicado por RANJANE e colaboradores (2010) com detecção UV. TAVARES e colaboradores (2011) recentemente descreveram a determinação de MGF em comprimidos utilizando a EC e a CLAE, ambos empregando detecção UV.

Além do método citado acima, a literatura descreve outro artigo publicado para determinação quantitativa do fármaco por EC. O método proposto por ELBASHIR e colaboradores (2008) utiliza NaOH 0,1 M como diluente, solvente no qual o fármaco mostra-se extremamente instável, sendo até mesmo utilizado para degradação nos estudos de isolamento e identificação do produto degradação nesta Tese. Em relação ao ensaio microbiológico, na literatura pesquisada não foram encontrados relatos descrevendo a determinação da potência do MGF.

A validação do método por E UV, sem a necessidade de derivatização e complexação da amostra, permitiu a determinação qualitativa e quantitativa de uma maneira rápida e usual, de extrema importância para o controle de qualidade de rotina de MGF nos comprimidos revestidos. A validação do método por E VIS é uma alternativa para identificação e quantificação do fármaco. Além disso, como o fundamento do método é a complexação da amina primária do fármaco com o reagente colorimétrico verde de bromocresol e extração com clorofórmio, produtos de degradação e, mesmo impurezas de síntese, que não possuem este grupamento químico na molécula, não formam o complexo, o que garante uma maior seletividade em comparação ao método simples por E UV. O método validado por E VIS demonstrou seletividade adequada para quantificar o fármaco MGF, mesmo na presença de sua principal impureza de síntese (ácido 1-ciclopropil-6-flúor-7-cloro-4-oxo-1,4-diidro-1,8-naftiridina-3-carboxílico).

Alternativamente, foram testadas combinações dos reagentes colorimétricos (azul de bromotimol e verde de bromocresol) com diclorometano para extração dos complexos formados, porém os resultados apresentaram grande variabilidade.

Os estudos de degradação forçada realizados proporcionaram o conhecimento dos principais fatores de degradação e a validação de métodos indicativos de estabilidade por CLAE, EC e ensaio microbiológico. Os resultados obtidos nos ensaios de degradação demonstraram a instabilidade de MGF em condições fotolíticas, ácidas, alcalinas e térmicas. Durante esta fase do desenvolvimento dos métodos analíticos objetivou-se a degradação entre 5 a 20% do fármaco na SQR e nos comprimidos, evitando a degradação muito drástica (ALSANTE *et al.*, 2007).

As curvas de pureza obtidas para o pico de MGF, obtido nas diferentes condições de degradação, demonstraram a seletividade do método por CLAE, indicando que, mesmo na presença de prováveis produtos de degradação, o método apresenta seletividade suficiente para quantificar o fármaco.

A validação do método por CLAE, com a utilização de condições usuais de coluna (C18) e detecção (UV) e sem a necessidade de adição de sais para tamponamento da fase móvel, permitiu a determinação qualitativa e quantitativa de uma maneira rápida e eficiente. Além disso, a capacidade do método de separação de MGF e seus produtos de degradação, formados em condições de estresse, garante a validação de um método cromatográfico indicativo de estabilidade, extremamente útil para estudos de estabilidade do fármaco.

Com base em trabalhos anteriormente desenvolvidos para análogos quinolônicos, também foi validado o ensaio microbiológico para determinação quantitativa de MGF nos comprimidos revestidos. O método apresenta-se como alternativo para quantificação do fármaco, pois se fundamenta na determinação da potência do mesmo por meio da inibição do crescimento de um micro-organismo sensível (HEWITT, 2004).

A EC proporcionou o desenvolvimento e validação de um método para quantificação do fármaco MGF e de sua principal impureza de síntese (ácido 1-ciclopropil-6-flúor-7-cloro-4-oxo-1,4-diidro-1,8-naftiridina-3-carboxílico) em comprimidos revestidos. No desenvolvimento do método foram testadas diferentes condições experimentais relacionadas às características do fármaco (pKa, solubilidade e estabilidade), do aparelho (modo e tempo de injeção, pré-

condicionamento do capilar, tensão aplicada e temperatura de análise), tamanho do capilar de sílica fundida e a utilização de quinolonas ou outras substâncias como padrão interno. Devido aos valores de pKa do fármaco MGF, foram avaliados como eletrólitos soluções tamponadas de fosfato de potássio monobásico, tetraborato de sódio, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), em diferentes concentrações molares (25 mM e 50 mM), na faixa de pH entre 3,0 e 10,0. A voltagem utilizada nos ensaios variou de 20 kV a 30 kV em capilar de sílica fundida com 48 cm (40 cm efetivo). O método desenvolvido e validado mostrou-se extremamente rápido, simples e adequado para quantificação do fármaco e da impureza de síntese nos comprimidos revestidos.

Os métodos propostos neste trabalho para quantificação de MGF em comprimidos foram comparados estatisticamente utilizando a ANOVA. O resultado demonstrou que não houve diferença significativa ($\alpha = 0,05$) entre os mesmos e, com isso, os métodos por CLAE, E UV, E VIS, ensaio microbiológico e EC mostraram-se intercambiáveis (Tabelas 13.1 e 13.2 apresentadas nos ANEXOS).

A validação de diferentes métodos analíticos para a determinação do fármaco nos comprimidos revestidos nos permite realizar considerações sobre as vantagens e desvantagens dos mesmos em nossos estudos. A CLAE se mostra o método mais utilizado pelas Farmacopeias para o controle de qualidade, pois apresenta ótima seletividade para quantificar a substância de interesse mesmo na presença de interferentes. A EC apresentou como grande vantagem, a possibilidade de determinação da principal impureza de síntese nas mesmas condições eletroforéticas desenvolvidas para o fármaco MGF, o que só seria possível na CLAE utilizando um sistema de gradiente. No entanto, nos estudos de degradação forçada, o método não apresentou sensibilidade ou capacidade de migração dos produtos de degradação, como verificado para a CLAE. O ensaio microbiológico apresenta a vantagem de determinar a potência do fármaco, ou seja, a atividade frente à microorganismos sensíveis. A E UV e a E Vis são métodos alternativos para o controle de qualidade do produto, mesmo apresentando-se menos seletivos.

A literatura descreve as condições descritas pelo FDA para realização do teste de dissolução para controle de qualidade dos comprimidos de MGF, utilizando 900 ml de HCl 0,01 M como meio de dissolução e pás a 50 rpm (FDA, 2011). No

entanto, neste trabalho o objetivo foi desenvolver um teste de dissolução baseado em dados *in vivo* obtidos da literatura. A determinação da solubilidade do fármaco proporcionou o conhecimento dos prováveis meios de dissolução. O fármaco apresentou condição *sink* em HCl 0,01M e em tampão fosfato pH 4,5, no entanto obteve-se solubilidade total da dose em 900 ml de tampão fosfato pH 6,0.

Estudos preliminares foram realizados utilizando 900 ml de HCl 0,01 M e tampão fosfato pH 6,0 e pH 6,8 como meios de dissolução a $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ e pás a 50 rpm. Os valores de porcentagem do fármaco dissolvido em relação ao tempo foram comparados com a fração absorvida do fármaco obtida por meio da deconvolução dos dados *in vivo*, utilizando o método de Loo-Riegelman (SHARGEL *et al.*, 2005; USP 34, 2011).

Os resultados obtidos para a liberação do fármaco utilizando tampão fosfato pH 6,0 demonstraram-se satisfatórios para a validação de um teste de dissolução baseado em dados *in vivo*. Realizaram-se dois perfis de dissolução dos comprimidos de Factive[®] (n =12) e os valores médios da porcentagem dissolvida foram plotados com os dados da fração absorvida do fármaco, obtendo-se um coeficiente de correlação de 0,9926 e um valor de inclinação de 0,8703, os quais se demonstraram adequados de acordo com a literatura (CARDOT e BEYSSAC, 2007; USP 34, 2011). Diante disso, foi realizada a validação do método analítico utilizando CLAE para determinação do teor dissolvido de MGF no teste de dissolução.

O estudo de estabilidade de MGF foi realizado por meio da degradação forçada do fármaco, para o desenvolvimento dos métodos analíticos indicativos de estabilidade, do comportamento do pó triturado dos comprimidos quando exposto à temperatura de 60 °C (calor seco) e do isolamento e a elucidação estrutural do produto de degradação majoritário obtidos nos estudos de degradação forçada.

Os resultados obtidos pelo método indicativo de estabilidade proposto por CLAE demonstraram que o fármaco MGF manteve-se estável ao calor seco a 60 °C, quando exposto sob a forma de comprimidos triturados, durante o período do estudo de 180 dias (Tabela 13.3 apresentada nos ANEXOS). Estudos de análogos quinolônicos também demonstraram a estabilidade térmica dos comprimidos de mesilato de pefloxacino (SOUZA, 1995) e da solução injetável de ofloxacino (EV,

1997), em diferentes temperaturas (40, 60 e 90 °C) e tempos de exposição (30, 60 e 90 dias). No entanto, FRÖEHLICH (1991) verificou aproximadamente 10% de degradação do norfloxacino em comprimidos, a 60 °C durante 90 dias, utilizando o ensaio microbiológico para determinação quantitativa.

A partir dos resultados de degradação forçada obtidos para a especificidade do método por CLAE, foram estudadas as condições mais favoráveis para o isolamento e elucidação estrutural do produto de degradação majoritária do MGF. Apesar de o fármaco MGF demonstrar ser instável à hidrólise ácida (HCl 0,1 M) e à radiação ultravioleta, não houve a formação de um produto de degradação majoritário.

A exposição do fármaco às condições de degradação em hidrólise alcalina em NaOH 0,2 M por 2 horas provocou o escurecimento da solução de MGF. Após a neutralização com HCl 0,2 M verificou-se a formação de um precipitado na solução, o qual após repouso para completa precipitação, foi centrifugado e seco em estufa a 40 °C. Posteriormente, o precipitado foi solubilizado em metanol e filtrado em membrana de 0,45 µm, para realização do isolamento por CLAE utilizando coluna semipreparativa.

O desenvolvimento do método por CLAE utilizando coluna semipreparativa apresentou bons resultados, pois permitiu adequada resolução entre os produtos de degradação formados em condições alcalinas e possibilitou a injeção de 90 µl da solução do produto de degradação. Além disso, ensaios realizados utilizando o método indicador de estabilidade por CLAE demonstraram a pureza da fração coletada.

Também foi avaliada a utilização do método por CCD analítica para separação dos produtos de degradação formados em condições fotolíticas e básicas. No entanto, análises empregando várias combinações de solventes não apresentaram resultados satisfatórios, pois ocorria a formação de cauda, impedindo a adequada separação entre os produtos de degradação formados e o fármaco MGF. A otimização de um método, utilizando CCD analítica, visava, posteriormente, a separação dos produtos de degradação por CCD semi-analítica.

Após isolamento de uma quantidade adequada do produto de degradação por CLAE semipreparativa, a elucidação estrutural, realizada utilizando os métodos de E IV, EM, RMN de ^1H , ^{13}C e de correlação por COSY, HSQC e HMBC (Figuras 13.1 a 13.6 apresentadas nos ANEXOS) e determinação de sódio por espectroscopia de emissão atômica, sugere-se que o produto de degradação isolado seja o sal sódico do ácido 7-amino-1-ciclopropil-6-fluor-1,4-diidro-4-oxo-1,8-naftiridina-3-carboxílico.

Como objetivo do trabalho também foi prevista a realização dos estudos de segurança biológica, os quais foram realizados no Departament de Fisiologia da Facultat de Farmàcia da Universitat de Barcelona (Espanha) e na Unidad de Toxicologia y Ecotoxicologia del Parc Científic de Barcelona. Esses estudos são justificados pelo potencial fototóxico e genotóxico de alguns membros da classe das fluorquinolonas.

Os estudos de citotoxicidade e fototoxicidade *in vitro* foram realizados utilizando linhagem de células de fibroblastos de ratos 3T3. Os estudos de citotoxicidade visam à diminuição do número de animais a serem expostos ao teste de toxicidade aguda, ou seja, são extremamente importantes na política de redução. O teste de fototoxicidade foi realizado utilizando o método preconizado pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD 432, 2004). Os resultados demonstraram que a impureza de síntese e o produto de degradação isolado são mais citotóxicos e fototóxicos que o fármaco MGF, demonstrando a importância da determinação quantitativa dessas substâncias no fármaco e no produto acabado.

Os estudos de genotoxicidade foram realizados utilizando o ensaio cometa com a mesma linhagem de células 3T3, utilizadas nos ensaios de citotoxicidade. O ensaio permite a detecção de quebras na estrutura do DNA e, nas condições do ensaio, o fármaco MGF mostrou-se mais genotóxico que suas substâncias relacionadas.

-
- A caracterização por E IV, RMN de ^1H , ^{13}C e faixa de fusão demonstraram a adequabilidade da SQR de MGF para ser utilizada como padrão nos estudos realizados nesse trabalho;
 - Os métodos propostos por CCD, E UV, E VIS, CLAE e EC demonstraram-se adequados para identificação qualitativa de MGF em comprimidos revestidos;
 - Os métodos propostos por E UV, E VIS, CLAE, ensaio microbiológico e EC apresentaram especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. Com isto, demonstraram-se adequados para a determinação quantitativa do MGF em comprimidos revestidos;
 - Os métodos validados por E UV, E VIS, CLAE, ensaio microbiológico e EC não apresentaram diferenças estatisticamente significativas de acordo com a ANOVA ($\alpha = 0,05$);
 - Sugere-se que as condições do teste de dissolução utilizando 900 ml de tampão fosfato de potássio pH 6,0 como meio de dissolução, equipamento com pás na rotação de 50 rpm simulam o comportamento *in vivo* do fármaco MGF a partir de dados da literatura;
 - Sugere-se que o sal sódico do ácido 7-amino-1-ciclopropil-6-flúor-1,4-diidro-4-oxo-1,8-naftiridina-3-carboxílico seja o produto de degradação isolado por CLAE semipreparativa e elucidado estruturalmente por E IV, EM, RMN ^1H , ^{13}C e de correlação (COSY, HSQC e HMBC) e espectrometria de emissão atômica;
 - Os ensaios de segurança biológica demonstraram o menor potencial citotóxico e fototóxico do fármaco MGF em comparação com suas substâncias relacionadas (impureza de síntese e o produto de degradação isolado). No entanto, o fármaco MGF apresentou maior potencial genotóxico e fotogenotóxico.

12. REFERÊNCIAS

- ACHÉ. Factive. São Paulo, 2006. 1 f. Bula.
- AHUJA, S. Assuring quality of drugs by monitoring impurities. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 3-11, 2007.
- ALBINI, A.; MONTI, S. Photophysics and photochemistry of fluoroquinolones. **Chemical Society Reviews**, v. 32, p. 228-250, 2003.
- ALSANTE, K.; ANDO, A.; BROWN, R.; ENSING, J.; HATAJIK, T. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 29-37, 2007.
- ALLEN, A.; BYGATE, E.; VOUSDEN, M.; OLIVER, S.; JOHNSON, M.; WARD, C.; CHEON, A.; CHOO, Y. S. KIM, I. Multiple-Dose Pharmacokinetics and Tolerability of Gemifloxacin Administered Orally to Healthy Volunteers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45(2), p. 540-545, 2001.
- ALTRIA, K. D.; KELLY, M. A.; CLARK, B. J. Current applications in the analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 17, p. 204-213, 1998.
- AMIDON, G.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.; CRISON, J. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlations on *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12(3), p. 413-419, 1995.
- ANON, J.; TILLOTSON, G. Gemifloxacin: A new treatment option in acute bacterial sinusitis. **Antibiotiques**, v. 10, p. 199-208, 2008.
- APPELBAUM, P. C.; HUNTER, P. A. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, p. 5-15, 2000.
- BALAJI, V.; POONGOTHAI, S.; MADHAVI, B.; REDDY, R.; NAIDU, P. Y., KARRUNAKARAN, C. M., ILAVARASAN, R. Development and validation of a dissolution test with spectrophotometric analysis for gemifloxacin in tablet dosage form. **Pharma Science Monitor**, ISSN 0976-7908. Online published.
- BALL, P.; MANDELL, L.; PATOU, G.; DANKNER, W.; TILLOTSON, G. A new respiratory fluoroquinolone, oral gemifloxacin: a safety profile in context. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, p. 421-429, 2004.
- BASAK, A.; RAW, A.; AL HAKIM, A.; FURNESS, S.; SAMAAAN, N.; GILL, D.; PATEL, H.; POWERS, R.; YU, L.; BASAK, S. Pharmaceutical impurities: Regulatory perspective for Abbreviated New Drug Applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 64-72, 2007.
- BÉLTRAN, J.L.; JIMENEZ-LOZANO, E.; BARRÓN, J.; BARBOSA, J. Determination of quinolone antimicrobial agents in strongly overlapped peaks from capillary electrophoresis using multivariate calibration methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 501, p. 137-141, 2004.

- BONILLA, F. Validação de metodologia para análise de moxifloxacino em comprimidos revestidos. Porto Alegre: UFRGS, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).
- BONILLA, F.; PAIM, C. S.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. Biological assay and liquid chromatographic method for analysis of moxifloxacin in tablets. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 1086-1092, 2005.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 1, de 29 de julho de 2005. Determina a publicação do Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 01 ago. 2005.
- BRITISH PHARMACOPOEIA 2008** (BP 2008). British Pharmacopoeia Commission Office. London: The Stationery Office, 2008.
- CARDOT, J.-M.; BEYSSAC, E. In Vitro–In Vivo Correlation. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. 2007. DOI 10.1081/E-EPT-120042219.
- CALVO, J.; MARTINEZ-MARTINEZ, L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 2009. Doi:10.1016/j.eimc.2008.11.001.
- DALHOFF, A.; SCHMITZ, F. J. In Vitro Antibacterial activity and pharmacodynamics of new quinolones. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease**, v. 22, p. 203-221, 2003.
- DANESHTALAB, M. Novel Synthetic Antibacterial Agents. **Topics in Heterocyclic Chemistry**, v. 2, p. 153-206, 2006.
- DOYLE, E.; FOWLES, S.; McDONNELL, D.; McCARTHY, R.; WHITE, S. Rapid determination of gemifloxacin in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 746, p. 191-198, 2000.
- DRESSMAN, J. B.; AMIDON, G. L.; REPPAS, C.; SHAH, V. P. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. **Pharmaceutical Research**, v. 15 (1), p. 11-22, 1998.
- ELBASHIR, A. A.; SAAD, B.; ALI, A. S. M.; AL-AZZAM, K.; ABOUL-ENEIN, H. Validated stability indicating assay of gemifloxacin and lomefloxacin in tablet formulations by capillary electrophoresis. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 31 (10), p. 1465-1477, 2008.
- ENGLER, M.; RÜSING, G.; SÖRGEL F.; HOLZGRABE, U. Defluorinated sparfloxacin as a new photoproduct identified by liquid chromatography coupled with UV detection and tandem mass spectrometry. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42 (5), p. 1151-1159, 1998.

EV, L. Estudo de estabilidade do ofloxacino em forma farmacêutica injetável. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 1997. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas).

Farmacopeia Brasileira 5 ed (FB 5). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. Volume 1 e 2.

FDA. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Dissolution Testing for Intermediate Release Solid Oral Dosage Forms. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 1997.

FDA. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms containing certain active moieties/active ingredients, based on Biopharmaceutics classification. 2000.

FDA. Food and Drug Administration. 2008. Prescribing Information. http://google2.fda.gov/search?q=cache:2FIWtiM2T4EJ:www.accessdata.fda.gov/drug_satfda_docs/label/2008/021158s013lbl.pdf+gemifloxacin&client=FDAgov&site=FDAgov&lr=&proxystylesheet=FDAgov&output=xml_no_dtd&ie=UTF-8&access=p&oe=UTF-8. Accessed in March 6, 2012.

FDA. Food and Drug Administration. 2011. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Dissolution methods. Disponível em: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_SearchResults_Dissolutions.cfm. Access in April 19, 2011.

FIERENS, C.; HILLAERT, S.; BOSSCHE, V. The qualitative and quantitative determination of quinolones of first and second generation by capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 22, p. 763-772, 2000.

FORD, J.; TINMINS, T. **Pharmaceutical Thermal Analysis: Techniques and Applications**. New York: Ellis Hor Wood Limited, 1989. p.108-135.

FRATINI, L. Estudo de métodos físico-químicos e microbiológicos para a análise de ciprofloxacino. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 1993. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

FRÖEHLICH, P.; SCHAPOVAL, E. Doseamento microbiológico de norfloxacino. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 12, p. 161-165, 1990.

FRÖEHLICH, P. Doseamento físico-químicos de norfloxacino. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 1991. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

GANDHIMATHI, M.; NAIR, B. D. K.; RAVI, T. K. Study of hydrolytic and oxidative behavior of gemifloxacin mesylate in aqueous solution by LC-MS. **Journal of Global Pharma Technology**, v. 2(1), p. 81-85, 2010.

GOTTLIEB, H.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. **Journal of Organic Chemistry**, v. 62, p. 7512-7515, 1997.

GROSSMAN, R.; ROTSCHAFER, J.; TAN, J. Antimicrobial treatment of lower respiratory tract infections in the hospital setting. **The American Journal of Medicine**, v. 118 (7A), p. 29S-38S, 2005.

HEWITT, W. **Microbiological Assay for Pharmaceutical Analysis**. New York: Interpham/CRC, 2004.

HONG, C.; KIM, Y.; CHANG, J.; KIM, S.; CHOI, H.; NAM, D.; KIM, Y.; KWAK, J. Novel fluoroquinolone antibacterial agents containing oxime-substituted (Aminomethyl) pyrrolidines: synthesis and antibacterial activity of 7-(4-(aminomethyl)-3-methoxyimino)pyrrolidin-1-yl)-1-cyclopropil-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydro[1,8]naphthyridine-3-carboxylic acid (LB20304). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40(22), p. 3584-3593, 1997.

HONG, C. Discovery of gemifloxacin (Factive, LB 20304a): a quinolone of a new generation. **Il Farmaco**, v. 56, p. 41-44, 2001.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Guideline on Stability Testing of New Drug Substance and Products Q1A(R2). ICH Steering Committee: Switzerland, 2003.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of Analytical methods text and methodology Q2(R1). ICH Steering Committee: Switzerland, 2005a.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Impurities: Guideline for Residual Solvents - Q3C (R3). ICH Steering Committee: Switzerland, 2005b.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Impurities in New Drug Substances - Q3A (R2). ICH Steering Committee: Switzerland, 2006a.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Impurities in New Drug Products - Q3B (R2). ICH Steering Committee: Switzerland, 2006b.

JONES, R. Microbiology of newer fluoroquinolones: focus on respiratory pathogens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 44, p. 213-220, 2002.

KAYS, M.; LISEK, C.; DENYS, G. Comparative in vitro and bactericidal activities of telithromycin against penicillin-nonsusceptible, levofloxacin-resistant, and macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* by time-kill methodology. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, p. 289-294, 2007.

KIM, E.; KOO, Y.; CHUNG, D. Chiral counter-current chromatography of gemifloxacin guided by capillary-electrophoresis using (+)-(18-crown-6)-tetracarboxylic acid as a chiral selector. **Journal of Chromatography A**, v. 1045, p. 119-124, 2004.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C. Trends in stability testing with emphasis on stability during distribution and storage. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 7, p. 857-858, 1999.

- KRISHNA, M. V.; SANKAR, D. G. Utility of α and π -acceptors for the spectrophotometric determination of gemifloxacin mesylate in pharmaceutical formulations. **E-Journal of chemistry**, v. 5, p. 493-498, 2008a.
- KRISHNA, M. V.; SANKAR, D. G. Spectrophotometric determination of gemifloxacin mesylate in pharmaceutical formulations through ion-pair complex formation. **E-Journal of chemistry**, v. 5, p. 515-520, 2008b.
- LANDERSDORFER, C. B.; KIRKPATRICK, C. M. J.; KINZIG, M.; BULLITA, J. B.; HOLZGRABE, U.; DRUSANO, G. L.; SÖRGEL, F. Competitive inhibition of renal tubular secretion of gemifloxacin by probenecid. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53(9), p. 3902-3907, 2009.
- LG Life Sciences. Gemifloxacin Mesylate. Certificado de Análise, 2008.
- LI, X.; ZHU, Z.; CHENG, X.; YANG, X. Quantitative structure – pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship for fluoroquinolones. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 41 (2), p. 23-28, 2007.
- LOPES, J. Cromatografia em Camada Delgada. In: COLLINS, C.; BRAGA, G.; BONATO, P. (Coord.). **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7. ed. São Paulo: Editora da Unicamp, 1997. p. 45-56.
- LOWE, M.; LAMB, H. Gemifloxacin. **Drugs**, v. 59(5), p. 1137-1147, 2000.
- LOVDAHL, M.; PRIEBE, S. Characterization of clinafloxacin photodegradation products by LC-MS/MS and NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, p. 521-534, 2000.
- MANADAS, R.; PINA, M.; VEIGA, F. Dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 375-399, 2002.
- MARONA, H. R. N.; SCHAPOVAL, E. E. S. Desarrollo de análisis microbiológico para la determinación de esparfloxacino en polvo y en tabletas de 200 mg. **Information Tecnológica**, v. 9(5), p. 254-254, 1998.
- MARONA, H. R. N. Esparfloxacino: estudo químico-farmacêutico e caracterização de mutantes resistentes. Porto Alegre: UFRGS, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2000. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas).
- MARQUES, M.; BROWN, W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. **Revista Analytica**, v. 1, p. 48-51, 2002.
- MARTINEZ-HIDALGO, M. P. V. Alternativas a la experimentación animal em toxicología: situación actual. **Acta Bioethica**, v. 13(1), p. 41-52, 2007.
- MATHKAR, S.; KUMAR, S.; BYSTOL, A.; OLAWOORE, K.; MIN, D.; MARKOVICH, R.; RUSTUM, A. The use of differential scanning calorimetry for the purity verification. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 627-631, 2009.

MATOS, J. R.; MERCURI, L. P.; BARROS, G. Análise Térmica Aplicada a Fármacos e Medicamentos. In: _____. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. Cap. 4, p. 32-64.

MATTHEWS, B. Regulatory aspects of stability testing in Europe. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 7, p. 831-856, 1999.

MICHALSKA, K.; PAJCHEL, G.; TYSKI, S. Determination of ciprofloxacin and its impurities by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1051, p. 267-272, 2004.

NUDELMAN, N. E. S. **Estabilidad de Medicamentos**. Buenos Aires: El Atheneo, 1975.

OECD guidelines for the testing of chemicals: test guideline 432. *In vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. Paris, OECD Publication Office, 2004.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy: A guide for students of organic chemistry**. 3th ed. South Melbourne: Brooks/Cole, 2001.

PICÓ, Y.; ANDREU, V. Fluoroquinolones in soil – risks and challenges. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, p. 1287-1299, 2007.

RANJANE, P. N; GANDHI, S. V; KADUKAR, S. S.; BOTHARA, K. G. Stability indicating RP-LC method for the determination of gemifloxacin mesylate. **Chromatographia**, v. 71, p. 1113-1117, 2010.

RAMJI, J. V.; AUSTIN, N. E; BOYLE, G. W.; CHALKER, M. H.; DUNCAN, G.; FAIRLESS, A. J.; HOLLIS, F. J.; McDONELL, D. F.; MUSICK, T. J.; SCHARDLOW, P.C. The disposition of gemifloxacin, a new fluoroquinolone antibiotic in rats and dogs. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 29, p. 435-442, 2001.

ROBLEDO, V. R.; SMYTH, W. F. A study of the analytical behaviour of selected new molecular entities using electrospray ionisation ion trap mass spectrometry, liquid chromatography, gas chromatography and polarography and their determination in serum at therapeutic concentrations. **Analytica Chimica Acta**, v. 623, p. 221-230, 2008.

RUIZ, T. P.; LOZANO, C. M.; SANZ, A.; BRAVO, E. Separation and simultaneous determination of quinolone antibiotics by capillary zone electrophoresis. **Chromatographia**, v. 49(7/8), p. 419-423, 1999.

SARAVOLTZ, L.; MANZOR, O; PAWLAK, J.; BELIAN, B. Antimicrobial activity and a comparison of published pharmacodynamics of gemifloxacin and eight fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 81-84, 2005.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. B. C. **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 2005.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2005.

- SKOUG, J.; HALSTEAD, D.; THEIS, D.; FREEMAN, J.; FAGAM, D.; ROHRS, B. Roteiro para desenvolvimento e validação do teste de dissolução em formas farmacêuticas sólidas para uso oral. **Pharmaceutical Technology**, abril, p. 34-43, 1997.
- SOUZA, F. M. Métodos físico-químicos e microbiológicos para controle de qualidade e estudo da estabilidade de pefloxacina. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 1995. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).
- STUART, B. **Infrared Spectroscopy: fundamentals and applications**. Toronto: John Wiley & Sons, 2004.
- SUGUMARAN, M.; MEGANATHAN, M.; VETRICHILVAN, V.; ADHIPARASAKTHI, T. Spectrophotometric method for the determination of gemifloxacin mesylate in bulk and pharmaceutical formulations. **Biotechnology Research Asia**, v. 5(1), p. 495-496, 2008. Resumo.
- SUNDERLAND, J.; TOBIN, C.; HEDGES, A.; MACGOWAN, A.; WHITE, L. Antimicrobial activity of fluoroquinolone photodegradation products determined by parallel-line bioassay and high performance liquid chromatography. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, p. 271-275, 2001.
- SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, n. 3, p. 12-20, 1998.
- TAVARES, V.F.; PATTO, D.; SINGH, A.; AURORA-PRADO, A., KEDOR-HACKMAN, M., SANTORO, M.I.R.M. Quantitative determination of gemifloxacin mesylate in tablets by capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30(4), p. 746-752, 2011. Resumo.
- THABAJ, K.; KULKARNI, S.; CHIMATADAR, S.; NANDIBEWOR, S. Oxidative transformation of ciprofloxacin by alkaline permanganate – A kinetic and mechanistic study. **Polyhedron**, v. 26, p. 4877-4885, 2007.
- TORNIAINEN, K.; TAMMILEHTO, S.; ULVI, V. The effect of pH, buffer type and drug concentration on the photodegradation of ciprofloxacin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 132, p. 53-61, 1996.
- TORNIAINEN, K.; MATTINEN, J.; ASKOLIN, C.; TAMMILEHTO, S. Structure elucidation of a photodegradation product of ciprofloxacin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, p. 887-894, 1997.
- USP 34**. THE UNITED STATES Pharmacopoeia. 34th ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2011.
- WATSON, G. D. **Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. London: Churchill Livingstone, 2005.
- ZHANEL, G.; NOREDDIN, A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the new fluoroquinolones: focus on respiratory infections. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, p. 1459-1463, 2001.

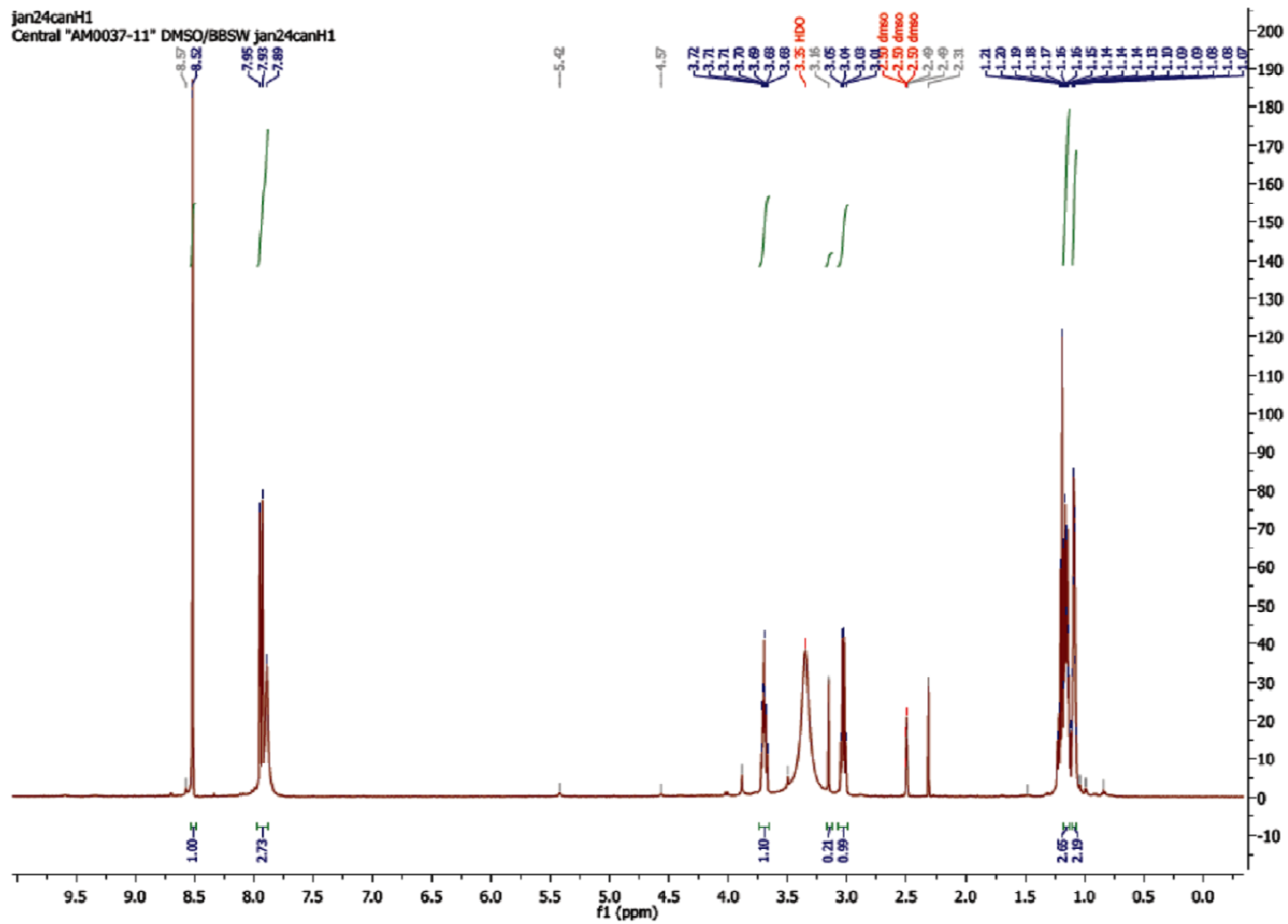


FIGURA 13.1. Espectro de RMN de ^1H do produto de degradação isolado.

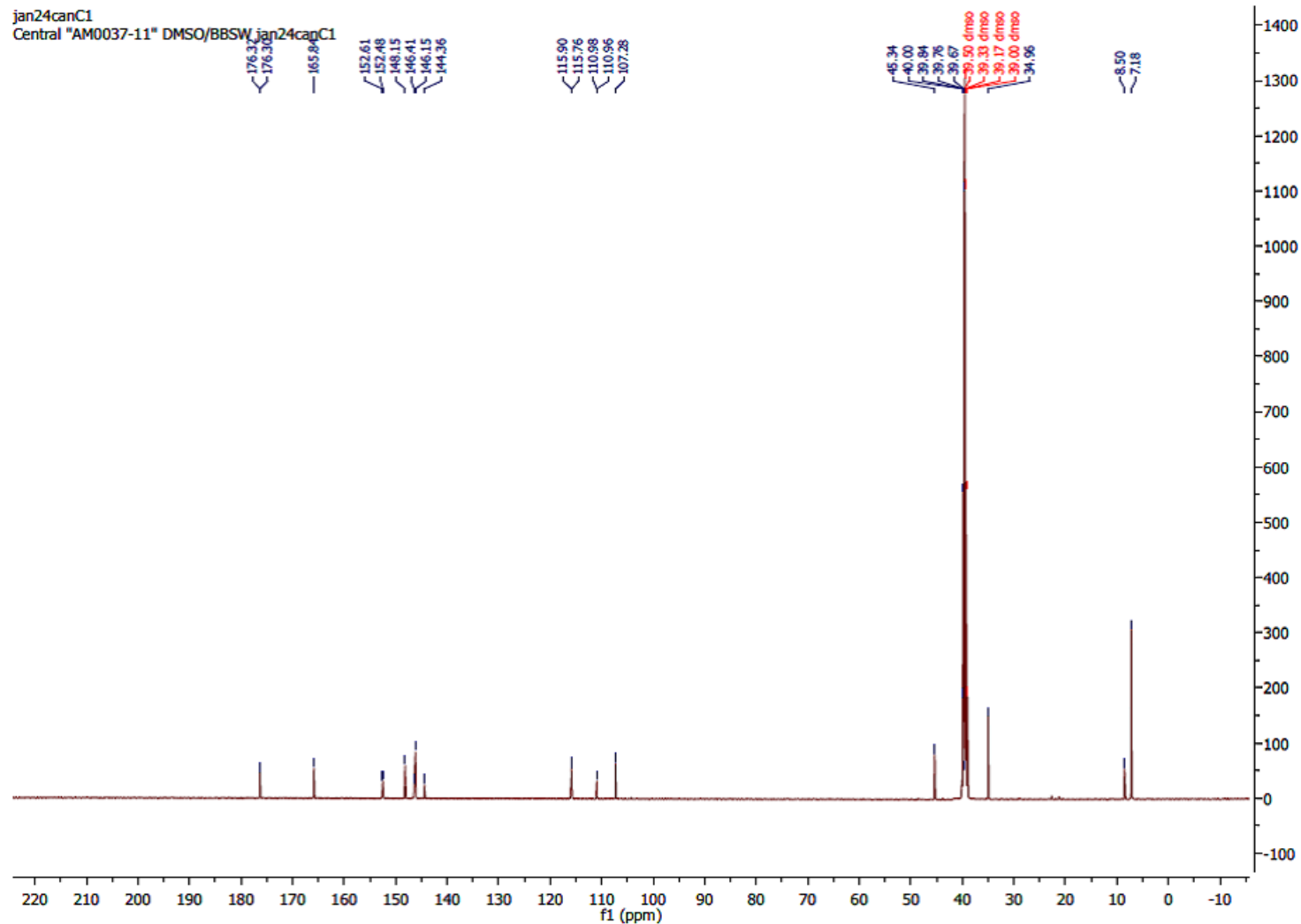


FIGURA 13.2. Espectro de RMN de ^{13}C do produto de degradação isolado.

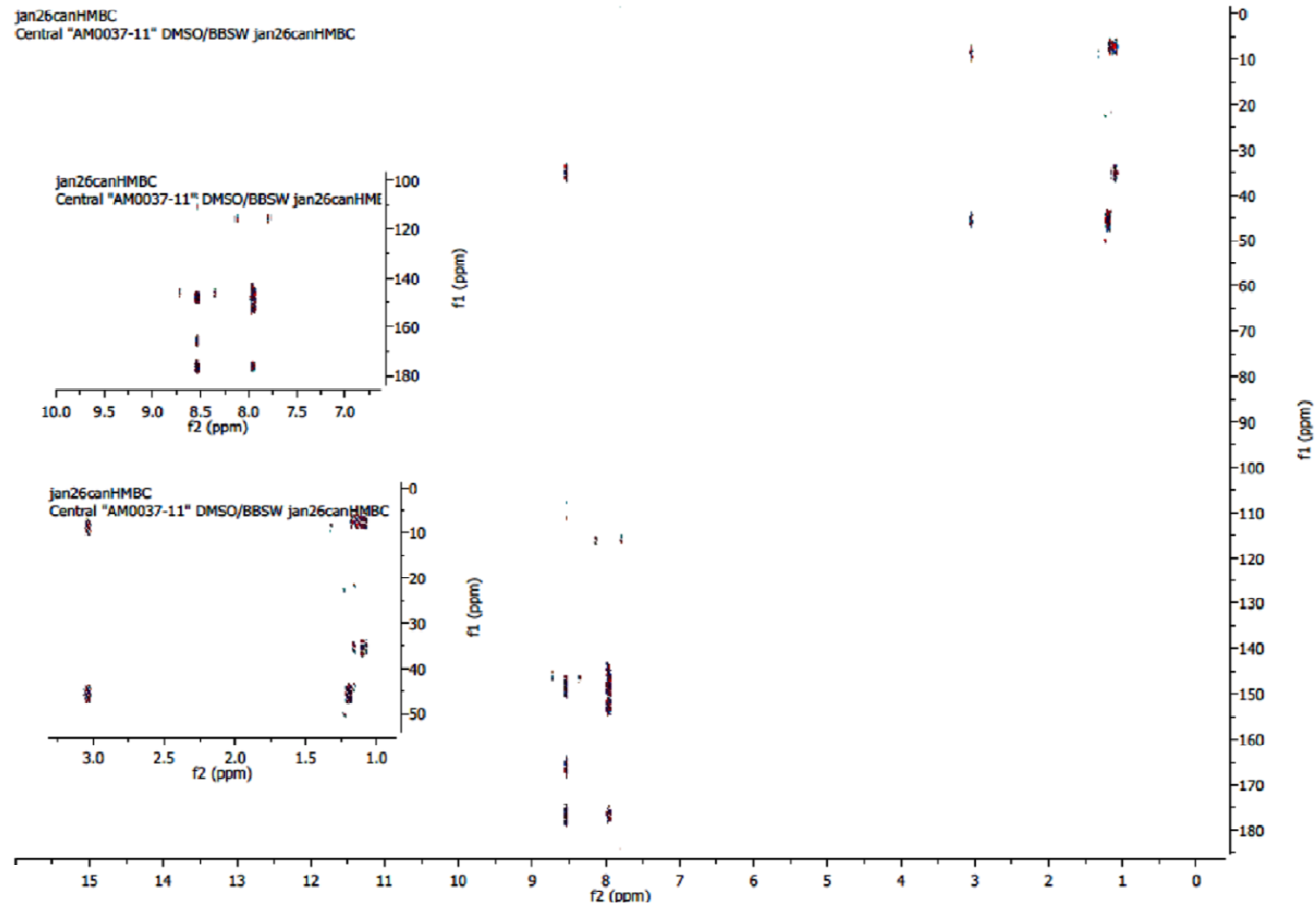


FIGURA 13.3. Espectro de RMN de HMBC do produto de degradação isolado.

jan24canHSQC1
Central "AM0037-11" DMSO/BBSW jan24canH1

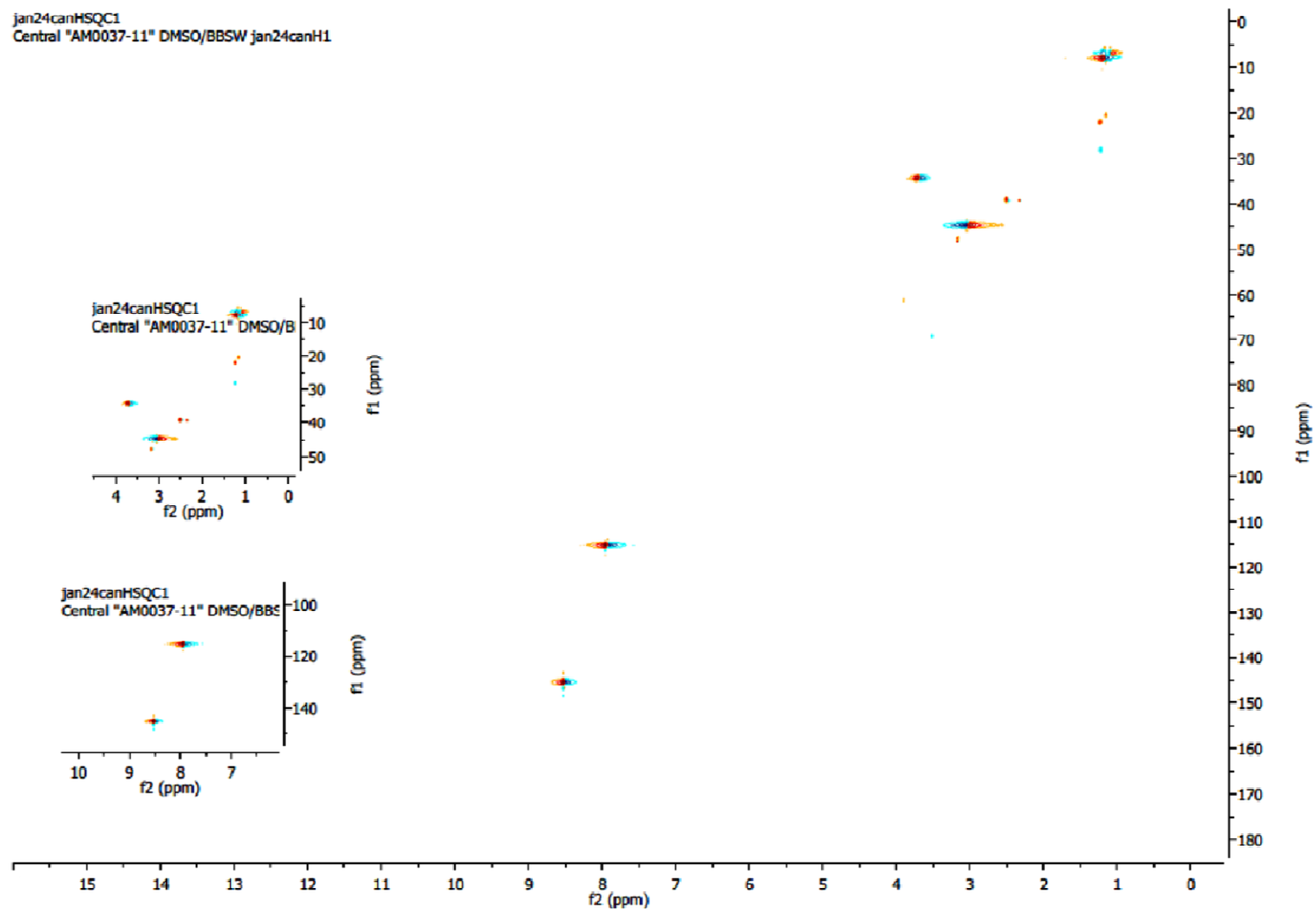


FIGURA 13.4. Espectro de RMN de HSQC do produto de degradação isolado.

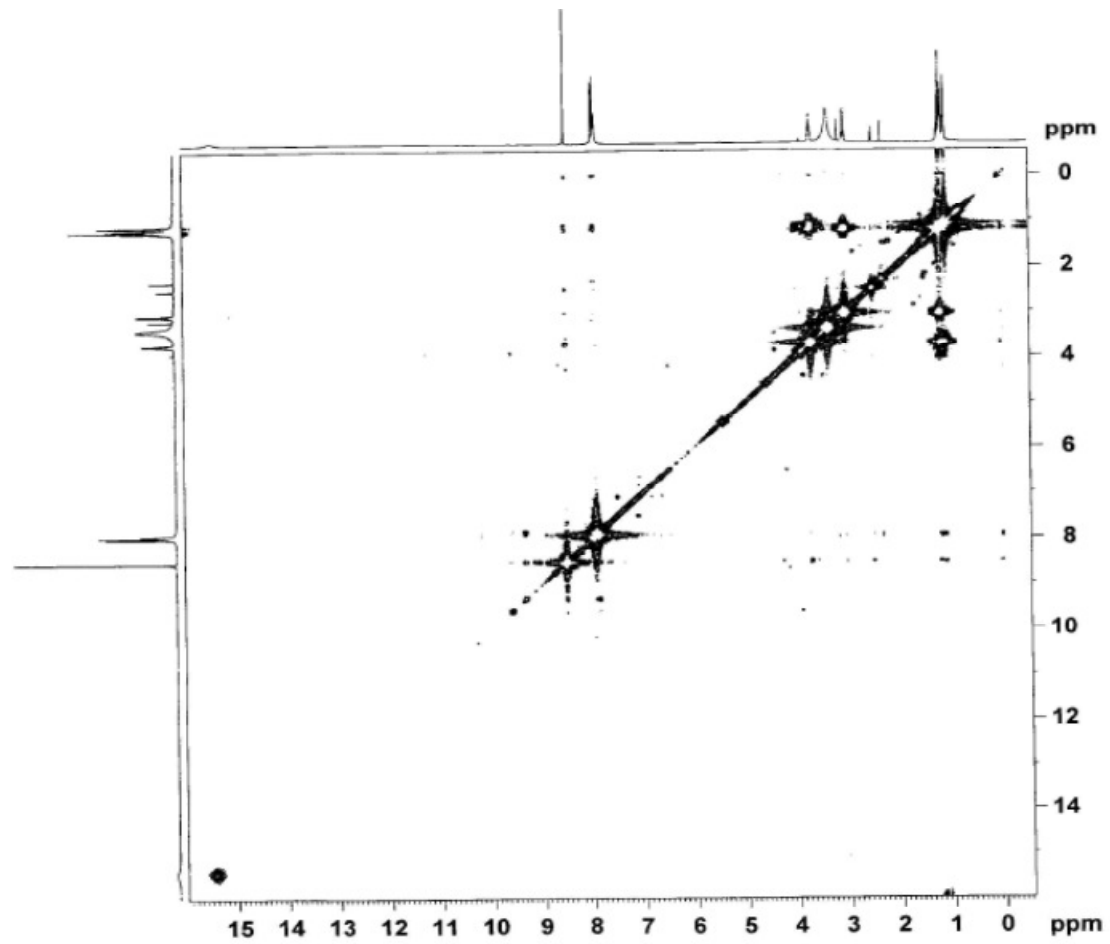


FIGURA 13.5. Espectro de RMN de COSY do produto de degradação isolado.

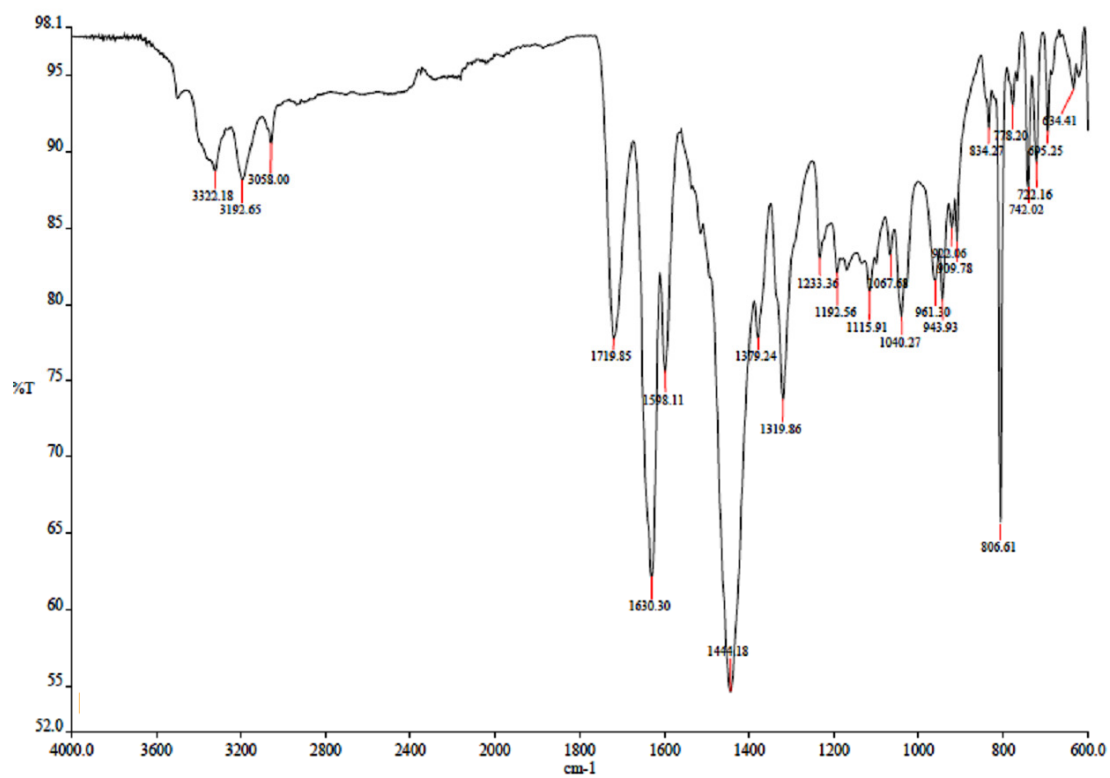


FIGURA 13.6. Espectro de absorção no infravermelho do produto de degradação isolado em condições alcalinas.

TABELA 13.1. Resumo dos resultados obtidos para determinação quantitativa de MGF utilizando diferentes métodos analíticos.

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Ensaio microbiológico	9	886,65	98,52	0,72
CLAE	18	1792,20	99,57	2,45
E UV (272 nm)	18	1766,91	98,16	2,52
E UV (343 nm)	18	1771,14	98,40	2,26
E Vis	18	1780,22	98,90	2,42
EC	18	1783,8	99,10	3,41

TABELA 13.2. Análise da variância (ANOVA) dos resultados obtidos para determinação quantitativa de MGF utilizando diferentes métodos analíticos.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	23,37	5	4,67	1,90	0,10	2,31
Dentro dos grupos	227,88	93	2,45			
Total	251,25	98				

TABELA 13.3. Resultados do estudo de estabilidade dos comprimidos triturados mantidos em estufa de calor seco a 60 °C.

<i>Tempo (min.)</i>	<i>Teor de MGF*</i>	<i>DPR (%)</i>
0	100,00	-
10	100,18	2,70
20	100,14	1,45
30	99,72	1,94
40	97,83	1,58
50	98,23	1,05
60	98,06	2,03
70	97,65	0,32
90	99,06	0,42
120	97,53	1,75
150	97,63	1,83
180	99,63	0,75

* média de 3 determinações.